

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



**David Přikryl**

Interakce retrovirových env glykoproteinů s receptory a vstup retroviru do buňky  
Interaction of retroviral env glycoproteins with receptors and virus entry into the cell

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Vladimír Pečenka, Ph.D.

Praha, 2013

### **Poděkování:**

Děkuji Ing. Vladimíru Pečenkovi, Ph.D. za cenné připomínky a rady při vypracování této bakalářské práce a za jeho čas. Rád bych také poděkoval celému kolektivu Laboratoře molekulární virologie a vybraným členům Laboratoře virové a buněčné genetiky za jejich četné intelektuální i hmotné impulzy, které vedly ke zvednutí úrovně této práce. Dále děkuji Lucii Pískové za revizi a svým rodičům za podporu v časech dobrých i zlých.

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16. 5. 2013

.....

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| Obsah.....  | 3  |
| Použité zkratky.....                                | 4  |
| Abstrakt .....                                      | 7  |
| Abstract .....                                      | 7  |
| 1 Úvod.....   | 8  |
| 2 Nespecifická adsorpce.....                        | 10 |
| 3 Specifická interakce .....                        | 13 |
| 3.1 Struktura a funkce obalových glykoproteinů..... | 13 |
| 3.2 Buněčné receptory .....                         | 14 |
| 3.2.1 Tva.....                                      | 14 |
| 3.2.2 Tvb .....                                     | 15 |
| 3.2.3 Tvc a další .....                             | 17 |
| 3.3 Rozšíření a změna hostitelské specifity.....    | 17 |
| 3.3.1 Selekcce a evoluce .....                      | 18 |
| 3.3.2 Inteligentní design .....                     | 19 |
| 4 Řízená fúze.....                                  | 22 |
| 4.1 Třídy a mechanismy fúzních proteinů .....       | 22 |
| 4.2 Dvoukroková aktivace .....                      | 26 |
| 5 Závěr.....  | 30 |
| Literatura .....                                    | 31 |

## Použité zkratky

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
| 6HB              | six helix bundle                                  | šesti helikální svazek                                     |
| AIDS             | acquired immune deficiency syndrome               | syndrom získaného selhání imunity                          |
| aMLV             | amphotropic murine leukemia virus                 | amfotropní myší leukemický virus                           |
| ASLV             | avian sarcoma and leukosis viruses                | ptačí sarkomové a leukosové viry                           |
| ASLV-A           | avian sarcoma and leukosis viruses subgroup A     | ptačí sarkomové a leukosové viry podskupiny A              |
| ASLV-B           | avian sarcoma and leukosis viruses subgroup B     | ptačí sarkomové a leukosové viry podskupiny B              |
| ASLV-C           | avian sarcoma and leukosis viruses subgroup C     | ptačí sarkomové a leukosové viry podskupiny C              |
| ASLV-D           | avian sarcoma and leukosis viruses subgroup D     | ptačí sarkomové a leukosové viry podskupiny D              |
| ASLV-E           | avian sarcoma and leukosis viruses subgroup E     | ptačí sarkomové a leukosové viry podskupiny E              |
| ASLV-J           | avian sarcoma and leukosis viruses subgroup J     | ptačí sarkomové a leukosové viry podskupiny J              |
| Ca <sup>2+</sup> | calcium cation                                    | vápenatý kation  |
| CAR1             | cytopathic ALSV receptor                          | cytopatický ASLV receptor                                  |
| CPZ              | chlorpromazine                                    | chlorpromazin  |
| DEAE             | diethylaminoethyl                                 | diethylaminoethyl  |
| DNA              | deoxyribonucleic acid                             | deoxyribonukleová kyselina                                 |
| ECM              | extracellular matrix                              | extracelulární matrix                                      |
| EGF              | epidermal growing factor                          | epidermální růstový faktor                                 |
| EGFR             | epidermal growing factor receptor                 | receptor epidermálního růstového faktoru                   |
| EGFRvIII         | type III mutant epidermal growing factor receptor | mutantní receptor epidermálního růstového faktoru typu III |
| eMLV             | ecotropic murine leukemia virus                   | ekotropní myší leukemický virus                            |
| env              | envelope glycoprotein                             | obalový glykoprotein                                       |
| EnvA             | envelope glycoprotein subgroup A                  | obalový glykoprotein podskupina A                          |
| EnvB             | envelope glycoprotein subgroup B                  | obalový glykoprotein podskupina B                          |
| EnvD             | envelope glycoprotein subgroup D                  | obalový glykoprotein podskupina D                          |

|                    |  |   |
|--------------------|--|---|
| EnvE               | envelope glycoprotein subgroup E                         | obalový glykoprotein podskupina E                         |
| EnvJ               | envelope glycoprotein subgroup J                         | obalový glykoprotein podskupina J                         |
| GAG                | glycosaminoglycan  | glykosaminoglykan   |
| GATE               | guided adaptors for targeted entry                       | provázené adaptory pro cílený vstup                       |
| HA                 | hemagglutinin  | hemagglutinin   |
| HA1                | hemagglutinin subunit 1                                  | hemagglutininová podjednotka 1                            |
| HA2                | hemagglutinin subunit 2                                  | hemagglutininová podjednotka 2                            |
| herβ1              | heregulin-beta 1   | heregulin-beta 1  |
| HIV                | human immunodeficiency virus                             | virus lidské imunitní nedostatečnosti                     |
| hr1                | host range 1   | hostitelský rozsah 1                                      |
| hr2                | host range 2   | hostitelský rozsah 2                                      |
| HR1                | heptad repeat 1  | sedmerná repetice 1                                       |
| HR2                | heptad repeat 2  | sedmerná repetice 2                                       |
| HR-A               | heptad repeat A  | sedmerná repetice A                                       |
| HR-B               | heptad repeat B  | sedmerná repetice B                                       |
| chNHE1             | chicken Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger type 1 | kuřecí Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> přenašeč typu 1    |
| JSRV               | jaagsiekte sheep retrovirus                              | jaagsiekte ovčí retrovirus                                |
| LDL                | low density lipoprotein                                  | nízkohustotní lipoprotein                                 |
| LDLR               | low density lipoprotein receptor                         | receptor nízkohustotního lipoproteinu                     |
| LTR                | long terminal repeat                                     | dlouhé koncové repetice                                   |
| NH <sub>4</sub> Cl | ammonium chloride  | chlorid amonný  |
| NTRE-4             | nontransforming recombinant<br>subgroup E-4              | netransformující rekombinantní<br>podskupina E-4          |
| PAE                | porcine aortic endothelial                               | prasečí aortální endotel                                  |
| pH                 | potential of hydrogen                                    | vodíkový potenciál  |
| SEAR               | subgroup E ASLV receptor                                 | receptor ASLV podskupiny E                                |
| SEM                | semenogelin  | semenogelin   |
| SEVI               | semen-derived enhancers of viral<br>infection            | amyloidy odvozené ze semene zesilující<br>virovou infekci |
| SNV                | spleen necrosis virus                                    | virus slinivkové nekrózy                                  |
| SR-D RSV           | Schmidt-Ruppin D Rous Sarcoma<br>virus                   | Schmidt-Ruppinův D kmen Rousova<br>sarkoma viru           |
| sTva               | soluble tumor virus a                                    | rozpuštěný tumorový virus a                               |
| SU                 | surface subunit  | povrchová podjednotka                                     |

|        |  |   |
|--------|--|---|
| TM     | transmembrane subunit  | transmembránová podjednotka                                     |
| TNF    | tumor necrosis factor  | faktor nádorové nekrózy   |
| Tva    | tumor virus a  | tumorový virus a  |
| Tva800 | tumor virus a 800  | tumorový virus a 800  |
| Tva950 | tumor virus a 950  | tumorový virus a 950  |
| Tvb    | tumor virus b  | tumorový virus b  |
| Tvc    | tumor virus c  | tumorový virus c  |
| TRAIL  | tumour necrosis factor-related<br>apoptosis-inducing ligands | faktor nádorové nekrózy-příbuzné<br>apoptózu-navozující ligandy |
| VEGF   | vascular endothelial growth factor                           | vaskulární endoteliální růstový faktor                          |
| vr1    | variable region 1  | variabilní oblast 1   |
| vr2    | variable region 2  | variabilní oblast 2   |
| vr3    | variable region 3  | variabilní oblast 3   |
| wt     | wild type  | divoký kmen   |

## **Abstrakt**

Lidé už si přizpůsobili mnoho druhů zvířat, rostlin a bakterií tak, aby sloužili jejím potřebám. Nyní nadešel čas využít také viry. Nejvýznamnější aplikace pro ně se zřejmě nacházejí v oblasti lidského zdraví. Konkrétně čeled' retrovirů je perfektní vektor pro přenos genů při léčbě genetických onemocnění nebo ke zničení nežádoucích, například nádorových buněk. K efektivnímu použití těchto vehiklů je potřeba překonat řadu problémů a hlouběji prozkoumat některé úseky života retrovirů. Tato práce některé z nich popisuje společně s možnými cestami jejich řešení. První popisovanou oblastí je nespecifická adsorpce virionu na buněčné povrchy, druhou je zajištění efektivní interakce mezi obalovými glykoproteiny a receptory vysoce specifickými pro cílený typ buněk a konečně řízená fúze membrán.

Klíčová slova: retrovirus, adsorpce, env, receptor, fúze

## **Abstract**

Humankind has adjusted many animals, plants and bacteria to serve their needs. Now the time has come to exploit also viruses. The most significant applications for them seem to lie in the sphere of human health. Particularly the family of retroviruses represent a perfect vectors for gene delivery to cure genetic diseases or to destroy undesirable, e.g. cancer cells. In order to efficiently use these vehicles, a series of problems must be overcome and some segments of retroviral life cycle must be more deeply explored. This work describes some of them along with possible ways to solve them. The first described area is nonspecific adsorption of virions on the cell surface, the second is securing effective interaction between envelope glycoproteins and receptors highly specific for the targeted cell type and finally driven fusion of membranes.

Key words: retrovirus, adsorption, env, receptor, fusion

# 1 Úvod

Významnou skupinou virů, jejichž výzkum se rozhodujícím způsobem zasloužil o položení základů retrovirologie, jsou ptačí sarkomové a leukosové viry (avian sarcoma and leukosis viruses, ASLV) z rodu alfaretrovirů. U nich byla poprvé odhalena souvislost s indukcí nádorů (Rous, 1910, 1911), a proto se kvůli poznání mechanismu tohoto jevu začala skupina ALSV jako první intenzivně studovat, následovaná ostatními retroviry.

V přírodních podmínkách, odborně prozaicky nazývaných *in vivo*, je téměř nemožné sledovat životní osudy jednotlivých virových partikulí: hledání vhodného hostitele, jejich snaha proniknout do jeho útrob a pomnožit se tam. Pro mimořádnou komplikovanost molekulárně biologických analýz *in vivo* byla většina dat získána za ne zcela přirozených podmínek v buněčných kulturách (*in vitro*), kde chybí složitá 3D struktura, buňky jsou často od sebe odděleny extracelulární matrix (extracellular matrix, ECM) a chybí také interakce s imunitním systémem. V kultuře navíc existují odlišné selekční tlaky než v organismu, což bylo třeba brát v úvahu při interpretaci výsledků.

Teprve s rozvojem technologií se experimenty začaly provádět za podmínek blízkých podmínkám *in vivo*; tento typ výzkumu se již výrazně soustředil na viry významné pro zdraví člověka. K nim se řadí viry hepatitid, chřipky, žluté zimnice, neštovic a samozřejmě virus lidské imunitní nedostatečnosti. Poslední zmíněný zástupce, HIV, patří k čeledi retrovirů, podčeledi orthoretrovirů, rodu lentivirů. Jeho důležitost je zřejmá, neboť AIDS, jehož je původcem, sužuje velkou část lidské populace a má devastující účinky. Pro pochopení mechanismů a dějů při infekci tímto retrovirem byly zásadní první poznatky získané studiem jiných retrovirů ba i studiem zástupců virů naprosto nepříbuzných. Ke studiu HIV proto přispěly nejen poznatky z oboru retrovirologie, ale i znalosti týkající se influenzaviru a dalších.

Poznání životního cyklu retrovirů vedlo k pochopení, že retroviry se skvěle hodí jako nástroje pro přenos nových genů do buněk a potenciálně i pro léčbu různých onemocnění, ať už ve formě cílené likvidace nechtěných buněk jako jsou například nádorové, anebo ve formě jemnější a elegantnější, kdy se buňkám s nevhodnou či chybějící alelou dodá alela správná. Teprve relativně nedávno ovšem technologie pokročily natolik, aby se přešlo od teorie k praxi a začaly se používat retrovirové vektory pro genové terapie. Při konstrukci těchto vektorů, optimalizaci postupů a řešení problémů, které se vyskytly při klinických testech (např. vznik neoplasií inzerční mutagenezí) se ukázaly jako nedocenitelné poznatky získané na zdánlivě



málo důležitých skupinách retrovirů infikujících člověku velmi vzdálené druhy (kuřata, myši, kočky atd.).

Tato práce si klade za cíl shrnout recentní poznání z jedné klíčové fáze životního cyklu retrovirů – vstupu viru do buňky, konkrétně dějů, které nastávají těsně před a během vstupu, kdy jde o nespecifickou absorpci virové partikule na buňky, specifickou interakci retrovirových obalových glykoproteinů (envelope glycoprotein, env) s buněčnými receptory a nakonec řízenou fúzi virové a buněčné membrány. Cílem je také vyvrátit rozšířené a mylné představy o tom, že viry jsou jen neživé objekty nemající žádné vlastnosti až do okamžiku vniknutí do hostitele, který jim poskytne luxus života, neboť složité děje a mechanismy využívané jednotlivými čeleděmi a rody virů jasně ukazují na komplexnost jejich výbavy, která zjevně funguje již mimo budoucího hostitele a u některých virů by dokonce mohlo dojít k jejich zařazení po boku domén Eukarya, Archaea a Bacteria (Nasir et al., 2012).

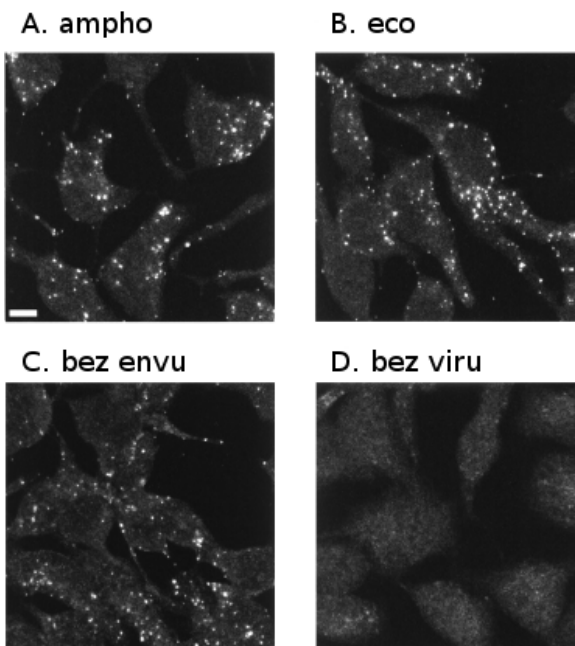
## 2 Nespecifická adsorpce

Prvním krokem k proniknutí viru do buňky je přisednutí virové partikule na buněčnou membránu. Při experimentech *in vitro* se virus šíří pouhou difuzí částice, kdy dojde k náhodnému nasednutí na membránu. Toto přichycení je nezávislé na přítomnosti virových obalových glykoproteinů (Pizzato et al., 1999), které zajišťují specifický kontakt s cílovou buňkou a v podstatě je i receptorově nezávislé, což způsobuje celou řadu problémů při aplikacích v genové terapii, kdy pouhé jedno promile virových částic je schopno infekce a kdy může dojít k „nešťastnému“ zachycení těchto partikulí necílovými buňkami. Nespecifická adheze je zprostředkována interakcí s buněčnými glukosaminoglykany (GAGy; Guibinga et al., 2002; Pizzato et al., 2001; Sherer et al.,

2010). V literatuře jsou pojmenovány a prozkoumány dva jevy, které jsou s adhezí těsně spjaty. První je nazýván „surfing“, druhý „surfacing“.

Surfing (Lehmann et al., 2005) nastává v případě, kdy virová částice volnou difúzí nasedne na buněčné filopodium. U několika skupin retrovirů byl pozorován náhodný pohyb částic po těchto filopodiích, který je ukončen v okamžiku nalezení receptoru nebo koreceptoru na „těle“ buňky. Doba náhodného pohybu se však liší u jednotlivých skupin virů a dokonce i u odlišných variant receptorů jako v případě Tva950 a Tva800. Vysvětlení snad tkví v kinetice asociace envů a jejich receptorů, jako je tomu například u zmíněných variant Tva (Gray et al., 2011). Po asociaci dojde k řízenému, cytoskeletálně závislému, pohybu partikule směrem k tělu buňky, do míst nazývaných jako endocytická horká místa, kde může dojít ke zmíněné endocytóze anebo přímo k fúzi.

Surfacing (Sherer et al., 2010) je pozorován naopak po sestavení nových virových částic. Tyto částice jsou po vypuštění z cytoplasmatické membrány po nějakou dobu přichyceny



**Obrázek 2.1**

Vazba MLV částic na TE671 buňky. Supernatant obsahující LacZ(MLV-A) (A), LacZ(MLV-E) (B), LacZ pseudotyp bez envu (C) a žádný virus (D) byl přidán na TE671 buňky. Po hodině byly důkladně odmyty a fixovány aceton-methanolem (1:1), částice byly označeny antiCA protilátkou a sekundární značenou protilátkou. Měřítka 5  $\mu$ m. Převzato z Pizzato et al., 1999.

k povrchu mateřské buňky, načež obvykle volně difundují do prostředí. Některé skupiny virů ale tento stav využijí k vytvoření filopodií, která následně navozují mezibuněčné kontakty, po kterých může virus putovat z jedné buňky na druhou, aniž by musel snižovat svoje šance na replikaci volnou difuzí skrz ECM.

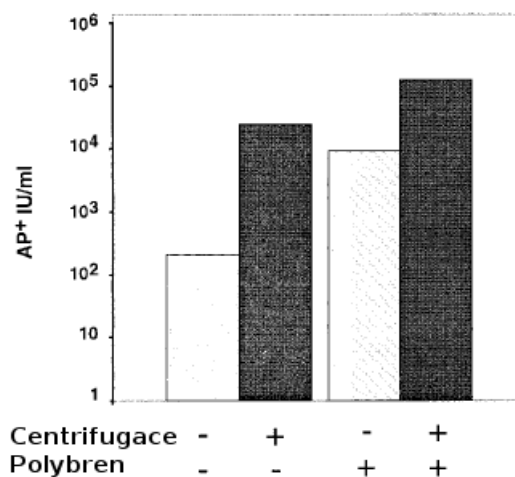
Celkové náboje buněčných, potažmo virových, membrán jsou záporné, v principu se tedy navzájem odpuzují, což ztěžuje kontakt virionu s buňkou. Tento problém se nejvíce projevuje při množení viru v kultuře. Jako nejúčinnější protipatření se jeví použití polykationtů, například polybrenu (hexadimetřin bromid) nebo DEAE-dextranu, kdy díky účasti polykationtu jako jakéhosi „spojníku“ dochází ke zmenšení vzájemného odpuzování buňky a viru, potažmo vzdálenosti mezi nimi a umožňuje tím vytvoření nespecifických i specifických interakcí a následnou infekci (Davis et al., 2002). Analogickým způsobem zřejmě působí i polykationty z přírodních zdrojů. Jedním z příkladů jsou virovou infekci zesilující amyloidy odvozené ze semene (semen-derived enhancers of viral infection, SEVI) a fragmenty semenogelinů (SEMy; Roan et al., 2011). Tyto fragmenty jsou vytvářeny nastříháním semenogelinů při ejakulaci prostatickými proteázami, čímž vznikají různé dlouhé peptidy. Některé z nich mají kladný náboj, který je důležitý jak pro úspěšné splnutí vajíčka a spermie, tak pro šíření viru HIV. Jedna z forem mužské sterility se projevuje velkým počtem neseštěřených prekurzorů SEMů a následně nízkého počtu jejich fragmentů, což mimo jiné vede ke snížení účinnosti šíření HIV. Naopak polyanionty způsobují pokles infekčnosti a to i v přítomnosti polybrenu; možným vysvětlením jejich efektu je blokování adheze na kladně nabitě buněčné glukosaminoglykany. Výjimkou je dextran sulfát, jehož nízké koncentrace sice v souladu s teorií inhibují infekci ALSV podskupiny B a C (ASLV-B, ASLV-C), ale vysoké koncentrace překvapivě naopak infekci těchto virů posilují (Toyoshima and Vogt, 1969).

Polybren a podobné látky však tímto způsobem nefungují vždy. Např. infekce virem ASLV-A je polybrenem naopak inhibována (Toyoshima and Vogt, 1969). Obalový glykoprotein ASLV-A (EnvA) totiž obsahuje v oblasti hr2 SU podjednotky konzervovaný úsek bazických aminokyselin, (Rong et al., 1997). V receptoru pro tento virus, Tva (tumor virus a), se naopak vyskytuje úsek několika kyselých aminokyselin (Rong et al., 1998). Jev se tak dá vysvětlit kompeticí polybrenu a EnvA o receptor Tva a blokováním interakce těchto dvou proteinů. Podobný jev byl pozorován i u dalších virů a receptorů (Jang et al., 2012). Polybren navíc nesvědčí některým typům buněk, jako například lidským mezenchymálním kmenovým buňkám (Lin et al., 2011). Při genovém přenosu pomocí retrovirů je proto důležité najít vždy podmínky optimální pro daný virus a buňky.

Jako vhodná alternativa se jeví použití centrifugace při inokulaci, tzv. spinokulace (Forestell et al., 1996), která několikanásobně zvyšuje účinnost infekce. Tato technika se používá od 20. let 20. století v diagnostických a mikrobiologických laboratořích avšak bez hlubšího pochopení mechanismu tohoto jevu. Dlouhou dobu se soudilo, že zesilující efekt má na svědomí prostá síla centrifugace, která doslova přitlačí virové partikule a cílové buňky k sobě (O'Doherty et al., 2000), ale toto tvrzení je v přímém rozporu se zjištěním, že při použití stejného viru se jednotlivé výtěžky liší v závislosti na buněčném typu. Při hlubším studiu

byla objevena závislost na aktinu (Guo et al., 2011). Stres vyvolaný spinokulací dokáže dočasně pozvednout produkci chemokinových receptorů pro HIV. Není nemyslitelné, že by mohlo dojít k nadprodukci i jiných membránových proteinů, konkrétně receptorů pro další skupiny virů, čímž by se vysvětloval tento jev i u ostatních případů užití spinokulace.

Při srovnání užití centrifugace a polykationtů je jasné vidět, že spinokulace má silnější efekt (Damico and Bates, 2000; O'Doherty et al., 2000). Spinokulace ale v některých případech také vykazuje cytotoxické účinky, proto je vždy třeba zvolit použití jedné z těchto metod a podmínek s ohledem na použité vektory a cílové buňky, stejně jako účel provádění experimentu.



**Obrázek 2.2**

Centrifugace a/nebo polybren podporuje infekci RCAS(A)-AP, který byl aplikován na 293T buňky v komplexu se sTva. Měření titru viru proběhlo 48 hodin po inokulaci/spinokulaci. Převzato z Damico and Bates, 2000.

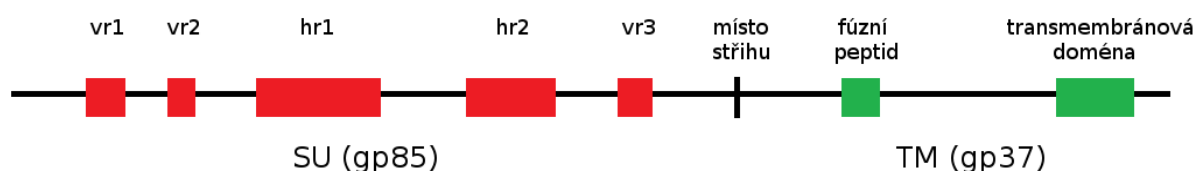
### 3 Specifická interakce

Dalším krokem v životě retroviru je specifická interakce obalových glykoproteinů s buněčnými receptory. Tento děj je komplexní a dobře prozkoumaný. Následující stat' je zaměřena především na obalové glykoproteiny ASLV, méně pak na další skupiny retrovirů.

#### 3.1 Struktura a funkce obalových glykoproteinů

Obalové glykoproteiny kódované každým obaleným virem mají napříč skupinami mnoho společných charakteristik. Jak bude detailněji vysvětleno dále, retroviry se řadí mezi skupinu virů s proteiny I. třídy. Jejich envy jsou syntetizovány jako prekurzory, které ještě v endoplasmatickém retikulu oligomerizují (Einfeld and Hunter, 1988) a jsou následně v pozdním Golgiho komplexu proteolyticky specificky rozštěpeny na dvě podjednotky. V případě ptačích retrovirů se jedná o prekurzor gp95 a podjednotky gp85 a gp37, později označované jako SU a TM kvůli jejich funkci (Buchhagen and Hanafusa, 1978; England et al., 1977; Leamnson and Halpern, 1976; Moelling and Hayami, 1977). Zatímco SU zřejmě určuje specifickou interakci, TM úsek zodpovídá za trimerizaci a ukotvuje celý komplex v membráně a nese fúzní peptid. TM podjednotka bude popsána v kapitole o řízené fúzi, proto se tato kapitola zaměří hlavně na SU podjednotku. Ta obsahuje konstantní a variabilní úseky, které determinují hostitelskou specifitu skrze interakci s buněčnými receptory. Tyto úseky byly u ASLV objeveny pomocí porovnání nukleotidových sekvencí nebo tvorbou mezipodskupinových rekombinantů (Bova et al., 1986; Hunter et al., 1983; Joho et al., 1975). Postupně byly nazvány vr1, vr2, hr1, hr2 a vr3 (variable region, host range). Časem výzkumníci našli spojitost posledních tří jmenovaných s hostitelskou specifitou (Bova et al., 1988; Dorner et al., 1985).

Po navázání SU na receptor dochází ke konformačním změnám (Gilbert et al., 1995; Sattentau and Moore, 1991) a v případě HIV i k plné disociaci (Moore et al., 1990). Tyto



**Obrázek 3.1**

Lineární zobrazení prekurzoru gp95. V části SU jsou červenou barvou zvýrazněny oblasti zodpovědné za hostitelskou specifitu, v části TM jsou zelenou barvou zvýrazněny hydrofilní oblasti procházející membránou. Mezi SU a TM je znázorněno i místo proteolytického stříhu.

změny jsou závislé na struktuře SU, jak dokazují experimenty s uměle zavedenými mutacemi, které v některých případech výrazně nesnížily vazebnou aktivitu SU, ale kompletně narušily jeho schopnost podstoupit uvedené změny (Damico et al., 1999). Ty jsou důležité pro odkrytí TM jednotky, která také podstoupí konformační změny vedoucí až k fúzi (Damico et al., 1998; Mothes et al., 2000). To vše ale u ptačích retrovirů nastává až v kyselém pH, proto je důležité, aby nejprve došlo k receptorem zprostředkované endocytóze závislé mimo jiné na klatrinu (Diaz-Griffero et al., 2005).

Expresí envu v infikovaných buňkách má zajímavé důsledky. Pomineme-li interferenci (vysvětleno dále), env podskupiny J výrazně přispívá dosud neznámým mechanismem ke vzniku specifických typů nádorů (Chesters et al., 2002). Tento jev se ale neomezuje jen na ptačí retroviry, podobný jev byl pozorován i u ovcí a jejich patogenu Jaagsiekte ovčího retroviru (JSRV, Jaagsiekte sheep retrovirus; Caporale et al., 2006). Také exprese env z endogenních retrovirů má své důsledky; nejenže interferuje se vstupem exogenních retrovirů podskupiny E, ale skrze tvorbu nefunkčních heterotrimerů s exogenními envy také může zhoršovat infektivitu produkovaných retrovirů jiných podskupin (Dewannieux and Collins, 2008).

## **3.2 Buněčné receptory**

ALSV se podle struktury Env dělí na 10 podskupin (A – J) vyznačujících se receptorovou specifitou a vnitroskupinovou interferencí. Po infekci virem totiž po krátké době dochází k interakci nově syntetizovaného envu s receptorem a k jeho zablokování či internalizaci, čímž buňka získává rezistenci vůči superinfekci virem stejné podskupiny (Vogt and Ishizaki, 1966). Receptory šesti podskupin ALV (A – E, J) již byly charakterizovány a klonovány. Jedná se o Tva rozeznávaný ASLV-A (Young et al., 1993), Tvb rozeznávaný ASLV-B, D a E (Adkins et al., 2000), Tvc rozeznávaný ASLV-C (Elleder et al., 2005) a chNHE1 rozeznávaný ASLV-J (Chai and Bates, 2006).

### **3.2.1 Tva**

Tva (tumor virus a) receptor ASLV-A (Young et al., 1993) byl identifikován jako protein podobný nízko hustotnímu lipoproteinovému receptoru (low density lipoprotein receptor-like, LDLR-like; Bates et al., 1993) a je hojně exprimován v rozmnožovacích orgánech (Elleder et al., 2005). Následkem alternativního sestřihu je Tva produkován ve dvou formách: Tva950 (transmembránová forma) a Tva800 (forma ukotvená v lipidových raftech prostřednictvím GPI kotvy – glykofosfatidilinositolu; Bates et al., 1993).

Tyto formy se od sebe liší nejen strukturou, ale i funkcí. Viriony jsou po rozpoznání jednoho nebo druhého Tva internalizovány do rozdílných buněčných kompartmentů a vykazují rozdílnou kinetiku fúze (Narayan et al., 2003). Zatímco Tva950 je recyklován známou endozom-lysosomální degradační dráhou, Tva800 je zřejmě spojen s dosud neznámou dráhou specifickou pro lipidové rafty. S tím se pojí fakt, že viriony internalizované Tva950 při užití inhibitorů jako  $\text{NH}_4\text{Cl}$  rychle ztratí schopnost infikovat hostitele, zatímco viriony internalizované Tva800 si tuto schopnost udrží několikanásobně delší dobu. Tva800-vázané viriony také do místa formace fúzního póru putují rychleji. Jejich fúze je totiž nezávislá na rychlosti pohybu endozomu, na rozdíl od Tva950 (Padilla-Parra et al., 2012). Tva800-vázané viriony ale vykazují pomalejší internalizaci a dokonce i pohyb po membráně než Tva950-vázané viriony (Lehmann et al., 2005). Ukazuje se totiž, že pro spuštění receptorem zprostředkované endocytózy je potřeba interakce s více molekulami Tva800 (Gray et al., 2011).

Za další formu Tva se dá považovat rozpustné Tva (soluble Tva, sTva), která má deletovanou transmembránovou doménu. Tato forma se běžně v kuřecím genomu nevyskytuje, je však využívána v řadě experimentů zaměřených především na studium fúze a na rozšíření hostitelské specifity. sTva totiž dokáže aktivovat env (včetně indukce expozice fúzního peptidu) a umožnit ALSV-A vstup do buněk, které neexprimují Tva (Damico and Bates, 2000).

V kuřatech se vyskytují i alely, které zajišťují svým homozygotním nositelům rezistenci. Jde například o  $\text{Tva}^r$  s jednobodovou mutací a  $\text{Tva}^{r2}$  se čtyřbazovým insertem narušujícím čtecí rámec (Elleder et al., 2004a). Lze ostatně předpokládat, že většina ptačích druhů a linií rezistentních k ALSV-A nese variantu Tva zachovávající původní buněčnou funkci, ale nefunkční jako ALSV-A receptor.

Funkce Tva u kuřat je dosud neznámá, jeho pozice a okolí je však konzervováno u člověka a myši, u kterých byl tento lokus spojen s genem pro receptor transkobalaminu (Elleder et al., 2004a; Quadros et al., 2009). V současné době se připravuje řada projektů k ověření této funkce i u kuřat.

### 3.2.2 Tvb

Již genetické mapování naznačovalo, že ALSV podskupin B, D a E rozeznávají různé alely téhož receptoru, označovaného jako Tvb (tumor virus b). Tvb je silně exprimován téměř ve všech tkáních (Elleder et al., 2005).

Byly popsány alely odlišující se různou citlivostí k B, D a E podskupinám, jako  $Tvb^{s1}$ ,  $Tvb^{s2a}$ ,  $Tvb^{s2b}$ ,  $Tvb^{s3}$ ,  $Tvb^q$ ,  $Tvb^t$ ,  $Tvb^r$  a  $Tvb^{r2}$  (Weiss, 1993, review; Reinišová et al., 2008). Jako první se podařilo izolovat lokus  $Tvb^{s3}$ , rozeznávaný podskupinami B a D, nikoliv však E. Byl identifikován jako CAR1, později zařazený do rodiny receptorů pro TRAIL faktory (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligands; Brojatsch et al., 1996; Smith et al., 1998). Varianta  $Tvb^{s1}$ , rozeznávaná podskupinou E, ne však B a D, byla poprvé nalezena v krocaních embryonálních fibroblastech a označena jako  $Tvb^t$  resp. SEAR (subgroup E ASLV receptor; Adkins et al., 1997). Rozdíl mezi  $Tvb^{s1}$  a  $Tvb^{s3}$ , který by vysvětloval citlivost k infekci, se našel v pozici 62 (cystein v  $Tvb^{s1}$  resp.  $Tvb^t$ , serin v  $Tvb^{s3}$ ; Adkins et al., 2000).

$Tvb^{s1}$  vykazuje zajímavý fenomén, totiž nerekiprokou interferenci. Preinfekce ALSV podskupiny B a D vede ke kompletnímu zablokování receptoru pro všechny skupiny rozeznávající  $Tvb$ . Preinfekce ALSV-E však vede k navození interference pouze pro podskupinu E, nikoliv pro B a D. Jev byl vysvětlen existencí dvou forem receptoru a rozdílnou interakcí receptorů s podskupinou E a s podskupinami B a D, přičemž EnvE interaguje jen s jednou z těchto forem (Adkins et al., 2001). Představa byla podpořena izolací peptidu o délce 15-ti aminokyselin z  $Tvb$ , který je schopen, podobně jako  $sTva$ , aktivovat env protein podskupiny B (a pravděpodobně i D), ne však E, a zprostředkovat infekci původně necitlivých buněk (Damico and Bates, 2000; Knauss and Young, 2002). O rozdílných interakcích svědčí i fakt, že jednobodová mutace (C125S) v  $Tvb^{s1}$  zeslabuje citlivost kuřecí linie M k ALSV podskupin B a D a kompletně ji ruší pro podskupinu E (Reinišová et al., 2008). Tato forma byla označena jako  $Tvb^{r2}$ . Je unikátní v tom, že je první popsanou mutací v oblasti CRD3, která byla dříve považovaná za zcela nedůležitou pro infekci (Klucking and Young, 2004). Popsaná mutace zřejmě interferuje se správným skládáním proteinu a bez dalšího nelze usuzovat na její přímou účast v interakci s env.

Výše uvedená zjištění jsou také v souladu s faktem, že ALSV podskupin B a D, ne však E, jsou cytotoxické. Byly identifikovány dva faktory zodpovědné za cytotoxicitu. Prvním faktorem jsou vlastnosti samotného receptoru; TRAIL receptory zprostředkovávají (kromě jiného) také indukci apoptózy. Již Adkins navrhl, že ALSV podskupin B a D interagují s receptorem takovým způsobem, že navozují oligomerizaci  $Tvb$  a spouštějí signalizaci vedoucí ke smrti buňky, kdežto ALSV-E interaguje způsobem, který apoptózu nespouští. Byl dokonce popsán fenomén, kdy buňka produkující a na povrchu vystavující EnvB indukuje apoptózu v sousedících buňkách exprimujících  $Tvb$  – „bystander killing, zabíjení kolemjdoucích“ (Diaz-Griffero et al., 2003). Interpretace výsledků byla ale později



zpochybněna a bylo dokonce ukázáno, že delece cytoplasmatické signalizační domény „smrti“ nevede ke zrušení cytotoxicity (Klucking et al., 2005).

Druhým, zřejmě rozhodujícím, faktorem je akumulace vysokého počtu neintegrováných provirů, jejichž volné konce jsou buňkou detekovány jako DNA zlomy. To spouští procesy související s opravou poškozené DNA a v případě dlouhodobé přítomnosti velkého počtu (až tisíců) provirů vyvolá programovanou buněčnou smrt. V souladu s tím jsou cytotoxické i jiné retroviry vytvářející (alespoň přechodně) vysoký počet neintegrováných provirů, včetně nepříbuzných SNV (Keshet and Temin, 1979). Všechny cytotoxické viry se zřejmě vyznačují nedostatečnou či pomalu navozovanou superinfekční resistencí (Weiss, 1993, review).

Funkce Tvb je pravděpodobně spojena s indukovanou buněčnou smrtí. Zdá se nelogické, že by selekce vybrala viru receptor právě tohoto charakteru, vzhledem k cytotoxicitě. Odpovědí může být již několikrát zmíněná interference. Skrze Tvb totiž může zřejmě docházet k čistce nakažených buněk jako formy ochrany organismu. Pokud virus syntézou envu dokáže tento pro něj nebezpečný receptor z buněčného povrchu odstranit, ochrání se tak částečně před imunitním systémem (Brojatsch et al., 1996).

### **3.2.3 Tvc a další**

Poslední ze skupiny lokusů Tv je Tvc, receptor pro ASLV-C. Byl nalezen díky těsnému chromosomálnímu sousedství s lokusem Tva (Elleder et al., 2004b) a identifikován jako příbuzný savčího butyrofilinu z imunoglobulinové superrodiny (Elleder et al., 2005). Je silně exprimován v orgánech spojených s imunitou a jeho předčasná terminace (v alele Tvc<sup>f</sup>) je příčinou rezistence některých kmenů.

Jako poslední byl identifikován receptor pro ASLV podskupiny J: jde o Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> přenašeč typu 1, chNHE1 (Chai and Bates, 2006). Receptory pro podskupiny F, G, H a I nebyly k dnešnímu dni identifikovány.

## **3.3 Rozšíření a změna hostitelské specifity**

V průběhu let se tu a tam vyskytly zvláštní varianty virů, schopné obejít omezení specifických env/receptor interakcí a dostat se za hranice svých původních hostitelů. Tato vlastnost byla nazvána rozšířený hostitelský rozsah (extended host range, EHR). Ten spočíval v získání schopnosti vázat další receptor (Dorner et al., 1985; Miller and Chen, 1996). Tato kapitola popisující možnosti změn hostitelské specifity byla rozdělena na dvě obsahově se prolínající podkapitoly: kapitolu o indukovaných a spontánních náhodných mutacích a kapitolu týkající se produktů cíleného genového inženýrství.

### 3.3.1 Selektce a evoluce

Dlouhou dobu se virologové přiklání k názoru, že vznik celé plejády envů ASLV je projevem ko-evoluce parazita a hostitele ve formě mutace původního envu anebo rekombinací, jako tomu zřejmě bylo u ASLV-J (Chai and Bates, 2006). Během evoluce totiž hostitel získává endogenní proviry kódující kompletní env protein, který může blokovat receptory pro exogenní virus (Robinson et al., 1981). V některých případech dochází dokonce k sekreci envu jako je tomu u křeččích linií, což vede až k úplnému zabránění infekce MLV (Miller and Miller, 1992). Tento jev vytváří neúprosný tlak selektující mutanty envů schopné interagovat s novými receptory. V některých případech ovšem může mít produkce endogenního env zcela paradoxní důsledek. Např. jeden typ kočičího exogenního viru s defektním env potřebuje k aktivaci receptoru spolupráci se sekretovaným proteinem, produktem komplementárně defektního endogenního env (Anderson et al., 2000).

Selekci a evoluci se podařilo napodobit aplikací rozpustných forem receptorů a získat tak několik mutantů vykazujících rozšířenou specifitu, tzv. únikových variant, jako například EnvA schopný interagovat dokonce i s Tvb<sup>s3</sup>; k získání této specifity stačily i jednobodové mutace (Holmen and Federspiel, 2000; Melder et al., 2003). Ke změně specifity může dojít také mezipodskupinovou rekombinací; tak vznikl například NTRE-4, který je chimérou složenou z částí EnvB a EnvE, což mu umožňuje využívat receptory pro obě podskupiny (Tsichlis et al., 1980).

Rozšířený hostitelský rozsah mají také ALSV podskupiny D, které dokážou infikovat i savčí buňky. Rozsáhlým mapováním pomocí rekombinací s ASLV-B (které tuto vlastnost postrádají) se zjistilo, že rozšířená specifita EnvD koreluje s jejich termolabilitou. Infekce savčích buněčných linií zřejmě vyžaduje změnu struktury env, ke které dochází při jeho zahřátí (Bova-Hill et al., 1991). Podobnou schopnost, tj. schopnost infikovat řadu původně rezistentních linií včetně savčích, vykazuje i EnvB mutovaný v pozicích 154 a 155 (Taplitz and Coffin, 1997; Rainey et al., 2003). Ve skutečnosti jen jedna z výše uvedených mutací (L154S) zodpovídá za rozšířený hostitelský rozsah. Paralelně s rozšířením specifity tato mutace vede (prozatím neznámým mechanismem) k oslabení interference, akumulaci neintegrovaných provirů a zvýšení cytotoxicity (Rainey and Coffin, 2005). Mutace T155I má jen pomocný efekt – snižuje cytotoxicitu mutantů L154S. Schopnost bodové mutace ovlivnit cytotoxicitu byla popsána i v dalších pracích, kde bylo navíc poukázáno na důležitost Ca<sup>2+</sup> v tomto procesu (Chang et al., 2005).

Tato a další podobná zjištění dokumentující schopnost retrovirů měnit hostitelský druh jsou důležitá vzhledem k narůstajícím tendencím k provádění xeno-transplantací, zvláště mezi prasaty a lidmi a vzhledem k obrovskému množství endogenních provirových elementů tvořících významnou část genomu všech živočišných druhů (Lavillette and Kabat, 2004).

Do kapitoly selekce patří i relativně efektivní, ale nekontrolovatelná, technika vyhledávání nových párů env/receptor pomocí záměny receptor-interagující domény ve známém env za náhodné sekvence (peptidové knihovny) a následné selekci funkčních variant (Sarangi et al., 2007).

### **3.3.2 Inteligentní design**

Současné i potenciální klinické aplikace retrovirů závisí na schopnosti vnést vybraný gen do specifického typu buněk a tam jej exprimovat. V ideálním případě, zejména pro cílenou destrukci nádorů, bude nutné zajistit infekci všech cílových buněk daného typu. Pro tak masivní aplikaci je bezpodmínečně nutná vysoká cílová specifita retrovirových vektorů. Té lze dosáhnout několika způsoby, nejlépe pak jejich kombinacemi. Jedním způsobem je použití env genu rozeznávajícího receptor přítomný velmi specificky pouze na sledovaném typu buněk. Žádný z dosud popsanych párů env/receptor nemá ani zdaleka takové vlastnosti; nelze ani doufat, že takové vlastnosti budou mít některé envy získané selekcí náhodně vytvořených variant (viz předchozí kapitola). Je proto snaha zkonstruovat envy inteligentním designem tak, aby rozeznávaly předem vybrané vysoce buněčně-specifické receptory.

Jedním z prvních příkladů bylo vnesení FLA16 peptidu, který specificky váže buněčné integriny, do ASLV-A (Valsesia-Wittmann et al., 1994). Ukázalo se však, že vnesení cizorodých sekvencí do určitých regionů zabraňuje správnému transportu envu na buněčný povrch. Vektor byl navíc funkční až po deglykosylaci v souladu s předpokladem, že cukerné zbytky se neúčastní env/receptorové interakce a jediný jejich možný efekt je negativní – blokováním této interakce při nesprávné glykosylaci. Proměnlivou úspěšnost měly pokusy s vnášením specifických receptor-rozeznávajících sekvencí do SU podjednotky ecotropního MLV: vnesení spojených 2,4-dinitrofenol – vázajících úseků těžkého a lehkého řetězce imunoglobulinu (Chu and Dornburg, 1995) – nízký titr virionů, vnesení LDLR-rozeznávající sekvence (Somia et al., 1995) – větší titr viru, ale stále pod úrovní wt eMLV a vnesení EGFR-rozeznávající sekvence (Cosset et al., 1995) – kompletní poškození schopnosti envu zprostředkovat fúzi i přes zachování schopnosti vázat receptor. To poukázalo na nutnost zachování konzistentní struktury SU, důležité pro interakci SU a TM při indukci fúze. Konzistenci struktury SU lze zřejmě udržet zachováním délky vnášených fragmentů (je

dovoleno samostatné a správné sbalení) a snahou o celkově malé ovlivnění envu (Katane et al., 2002; Miyakawa et al., 2008). Experimenty s krátkými úseky cizorodých ligandů v poslední době však přinesly své ovoce (Bahrami et al., 2012), cesta ke klinickému využití je však ještě dlouhá.

Nízkou životaschopnost zkonstruovaného viru kvůli slabé interakci envu s receptorem nebo částečnému porušení jiné funkce bylo často možné zlepšit kombinací inteligentního designu se selekcí a evolucí – pasážováním připraveného rekombinantního viru na vhodných buňkách. To umožnilo optimalizovat veškeré nuance jednotlivých funkcí envu včetně alternativního sestřihu (Logg et al., 2007), které jsou nepostižitelné a nepředvídatelné při inteligentním designu. Takto se například podařilo získat řadu vektorů založených na ASLV s vneseným envem z amfotropního MLV (Barsov et al., 2001). V případech, kdy vnesení cizorodého fragmentu kompletně zablokovalo schopnost envu vyvolat fúzi membrán, nebylo možné tuto strategii použít a jediným řešením byl výběr jiného páru ligand-receptor (Ryu et al., 2008).

Později byla vyvinuta metoda, která shora popisované problémy obešla rozdílnou a jednodušší strategií: použitím ligand-receptorových můstků, nyní nazývaných GATE (guided adaptors for targeted entry). Metoda byla vypracována na retroviru ASLV-A, který rozeznává receptor Tva. První ligand-receptorový můstek byl zkonstruován jako fúze EGF s Tva (Snitkovsky and Young, 1998). Díky tomuto můstku bylo možné docílit infekce buněk neexprimujících Tva, ale exprimujících EGF receptor a to u vhodných buněčných linií s účinností až 10 – 23 % v porovnání s účinností ALSV-A na buňkách exprimujících Tva. Dalším testovaným můstkem byla fúze Tva-MR1, kde MR1 je jednořetězcová protilátka specificky rozeznávající EGFRvIII, což je onkogenní deleční varianta EGFR často se nacházející na povrchu některých typů nádorů (Snitkovsky et al., 2000; Batra et al., 1995; Wong et al., 1992; Moscatello et al., 1995). Tento můstek zprostředkoval infekci příslušných linií s účinností cca 7 %. Současně však bylo pozorováno, že ASLV-A dokázal infikovat, byť na úrovni stěží detekovatelné, i lidské buňky 293T (imortalizované lidské ledvinné embryonální buňky), které neobsahují EGFRvIII ani Tva. To vyvolává pochybnosti, zda toto „pozadí“ je z bezpečnostního hlediska akceptovatelné v klinické aplikaci (Fisher et al., 1999). Podobná účinnost (9 %) i „pozadí“ (na buňkách PAE, porcine aortic endothelial cells) byly pozorovány s fúzním můstkem Tva-VEGF (Snitkovsky et al., 2001), načež úspěch pokračoval vytvořením Tva-herβ1 s účinností 5 %, kde herβ1 je heregulinový receptor (Snitkovsky and Young, 2002).

Jiné experimenty se zaměřily na ASLV-B a envB konstrukcí fúze Tvb-EGF (Boerger et al., 1999). Oproti předchozím zvyklostem, kdy viriony, GATE i buňky byly inkubovány společně, byly tentokrát GATE nejprve preinkubovány s viriony. Po přidání komplexu (ASLV-B)-(Tvb-EGF) k buňkám byla pozorována 29% úspěšnost infekce. Analogicky provedený experiment s komplexem (ASLV-A)-(Tva-EGF) však naopak nevedl k žádné infekci. Chování ALSV-A bylo v souladu s obecně přijímaným modelem, kdy u ASLV dochází nejprve k receptorem vyvolané aktivaci a následně k pH závislé fúzi. Tento mezikrok je považován za nestabilní, což by vysvětlovalo selhání experimentů tohoto druhu. Otázkou zůstává, proč bylo u ASLV-B pozorováno chování, které se zdá být s modelem v rozporu.

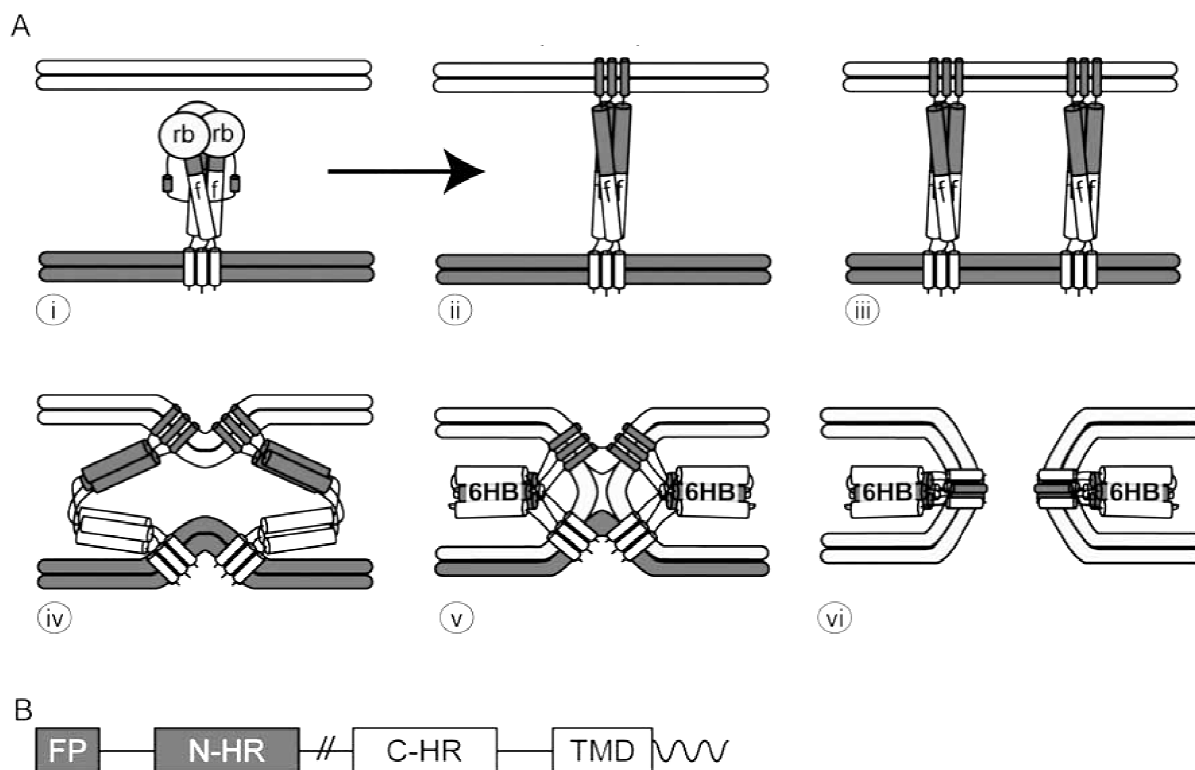
Lze předpokládat, že účinnost GATE proteinů není ASLV specifické a bude možné je použít i pro jiné retrovirové vektory, vhodnější pro klinické použití.

## 4 Řízená fúze

### 4.1 Třídy a mechanismy fúzních proteinů

Posledním a kritickým krokem při vstupu obalených virů do buňky je fúze membrán a následné uvolnění nukleokapsidy do napadené buňky. Tento děj neprobíhá samovolně, proto se u různých skupin virů vyvinuly různé mechanismy, jak fúzi vyvolat. Všechny mají společné charakteristiky: fúze je zajišťovaná obalovým glykoproteinem, schopným vytvořit tzv. fúzní peptid – vyčnívající externí strukturu z hydrofobních aminokyselinových zbytků.

Podle své struktury a mechanismus fúze jsou obalové glykoproteiny děleny do několika nadskupin a podskupin. První velká skupina se označuje jako I. třída fúzních proteinů. Typický a nejlépe prostudovaný představitel této skupiny je hemagglutinin influenzaviru (Colman and Lawrence, 2003, review). Hemagglutinin je syntetizován jako celek a během transportu mezi buněčnými kompartmenty vytváří funkční trimer, načež je každý z monomerů proteolyticky rozštěpen na dva samostatné polypeptidy spojené cysteinovými můstky, označované jako HA1 a HA2 (Einfeld and Hunter, 1988). Zatímco HA1 zřejmě zodpovídá za interakci s receptorem, HA2 nese na svém N-konci fúzní peptid a blízko C-konce je ukotven v membráně. Dlouho se soudilo, že po přestřižení prekursoru HA dochází k drastickým strukturním změnám, ale k těm dochází jen v těsné blízkosti místa stříhu. Hydrofobní fúzní peptid je zanořen do negativně nabitě kapsy tvořené dvojicí asparágových kyselin v pozicích 109 a 112 původního prekursoru. Zde setrvává až do aktivace, skryt v jádru trimerního. Tato aktivace nastává po rozpoznání receptoru a následné endocytóze, kdy nižší pH endozomu navodí konformační změny HA2 vedoucí k protažení celého úseku a zanoření fúzního peptidu do cílové membrány. Kromě onoho hydrofobního konce obsahuje HA2 i úseky HR-A a HR-B (nebo také HR1 a HR2), což jsou alfa-helixové struktury na N-konci a C-konci. Právě tyto úseky, spojené volnou smyčkou, spolu v další fázi antiparalelně asociují a vytvoří útvar zvaný šestihelikální svazek (six-helix bundle, 6HB), čímž je fúzní peptid společně s cílovou membránou přitažen k transmembránové části HA2, což nakonec vede k řízené fúzi.



#### Obrázek 4.1.1

Podschéma A:

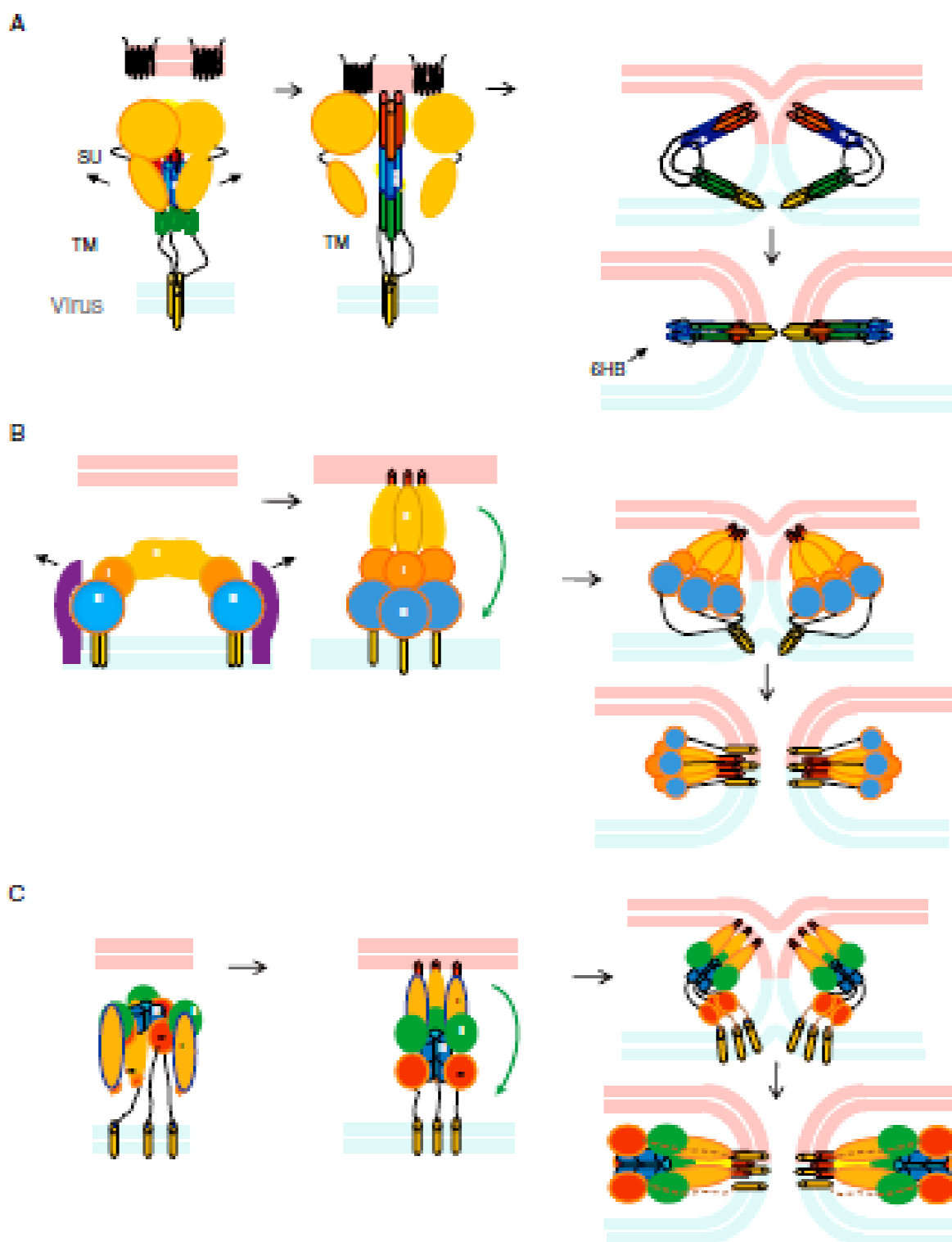
- i. Neaktivovaný stav, receptor-vázací doména je označena jako rb, fúzní doména je označena jako f.
- ii. Aktivovaný prefúzní stav, fúzní peptid je zanořen do cílové membrány, následuje HR1, volná smyčka, HR2 a transmembránová doména kotví protein ve virové membráně.
- iii. Pár fúzních podjednotek spojujících cílovou a virovou membránu.
- iv. Přiblížování HR1 a HR2 segmentů a membrán.
- v. Stádium hemifúze. HR1 a HR2 již vytvořily šesti helikální svazek (značeno 6HB), ale ještě nedošlo k formaci fúzního póru.
- vi. Úplné přiblížení fúzního peptidu a transmembránové domény, formace fúzního póru.

Podschéma B:

Naznačení primární struktury fúzní (TM) podjednotky. Fúzní peptid je označen jako FP, HR1 jako N-HR, HR2 jako C-HR a transmembránová podjednotka jako TMD. Mezi N-HR a C-HR je naznačena volná smyčka umožňující formaci 6HB.

Převzato z White et al., 2008, review.

Závislost na nízkém pH ale není jediný druh spouštěcího mechanismu. K I. třídě fúzních proteinů se řadí i glykoproteiny k jejichž aktivaci postačuje interakce s receptorem. K virům s takovými glykoproteiny se řadí například HIV a paramyxoviry. Struktura tohoto druhu glykoproteinu, u paramyxovirů označovaného jako F protein, je podobná hemagglutininu influenzaviru, rozdíl je pouze v jeho nezávislosti na pH.



**Obrázek 4.1.2**

Schematické srovnání obalových glykoproteinů s fúzními doménami I. (A), II. (B) a III. (C) třídy.

Na všech schématech je vidět první krok, těsně před aktivací, následné zanoření fúzních domén do cílové membrány, stádium hemifúze a formace fúzního póru. Převzato z Cosset and Lavillette, 2011, review.

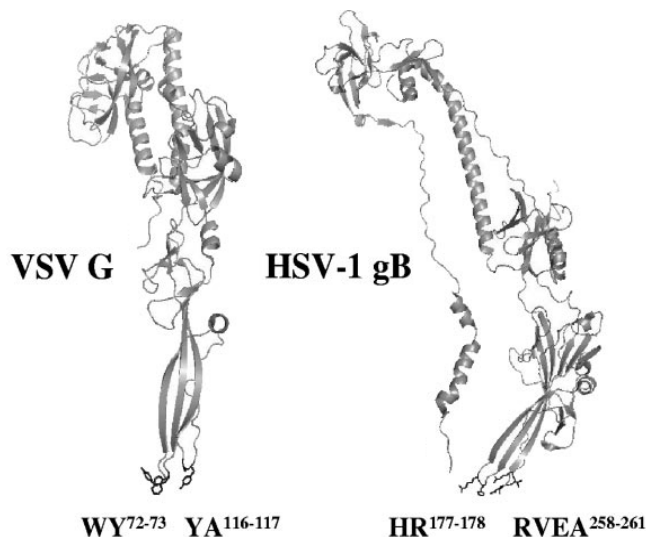


Zvláštní postavení mezi fúzními proteiny I. třídy má skupina ptačích alfaretrovirů, ASLV. Dlouho se soudilo, že jejich fúze je pH nezávislá, rigorózně provedené experimenty ale prokázaly složitý a unikátní systém aktivace závislý na pH. Ten bude představen ve zvláštní podkapitole níže.

Druhá velká skupina se nazývá II. třída fúzních proteinů. Od I. třídy se liší v několika aspektech. Nejlépe prostudovaný virus využívající fúzní proteiny II. druhu je alfavirus. Zatímco hemagglutinin influenzaviru tvoří po translaci trimer, E1 (obalový glykoprotein alfaviru) tvoří dimer s dalším proteinem zvaným p62 nebo také PE2 (Kielian, 2006, review). Ten je během transportu na buněčný povrch proteolyticky rozštěpen na dva polypeptidy, E2 a E3. Polypeptid E2 je ukotven v membráně a zůstává asociován s E1, E3 je většinou z komplexu uvolněn. Nakonec se tři heterodimery E2/E1 spojí do hexameru. E2 zajišťuje interakci s buněčnými receptory. Následná endocytóza a snížené pH v endozomu vyvolá konformační změny E2 vedoucí k disociaci od E1, který zůstává ve formě trimeru. V útrobách E1 se nachází fúzní smyčka, která se zanoří do cílové membrány. Tento děj jeví známky závislosti na cholesterolu přítomném v buněčné membráně. Po zanoření fúzní smyčky dojde k dalším konformačním změnám vedoucím až k přiblížení fúzní smyčky a transmembránové části E1 a následné fúzi membrán.

Nedávno byla popsána další třída fúzních proteinů vyskytujících se například u viru vezikulární stomatitidy nebo herpesvirů označována jako III. třída fúzních proteinů (Heldwein et al., 2006; Roche et al., 2006). Sdílejí některé vlastnosti s I. a II. třídou, jejich unikátnost však stála za jejich vyčlenění. Stejně jako ostatní třídy tvoří funkční trimery, ve kterých se před okolním prostředím skrývá dvojice fúzních hydrofobních smyček zanořujících se po přechodu do aktivního stádia do dvojvrstvy hostitelské membrány.

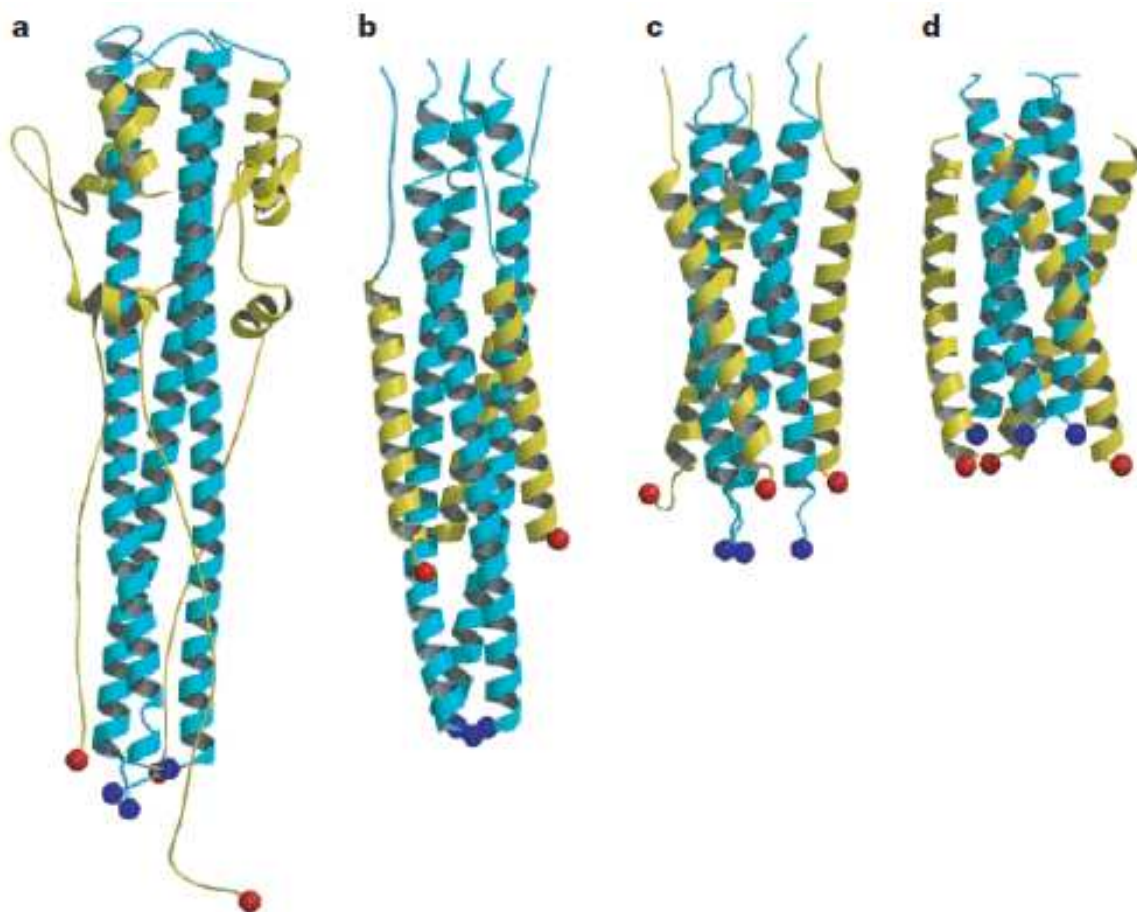
Přechod konformačních stavů je pH závislý a mechanismus přiblížení transmembránové a fúzní domény připomínají II. třídu. Všechny tři stavy (neaktivovaný, aktivovaný prefúzní



**Obrázek 4.1.3.**

Strukturní obalových glykoproteinů III. třídy virů vezikulární stomatitidy a herpes simplex. Na obrázku jsou vypsány aminokyseliny, které jsou součástí hydrofobních fúzních smyček i s jejich pozicemi. Převzato s Backovic et al., 2007.

a postfúzní) jsou navíc reverzibilní a mohou mezi sebou volně přecházet dle úrovně okyselení jednotlivých domén.



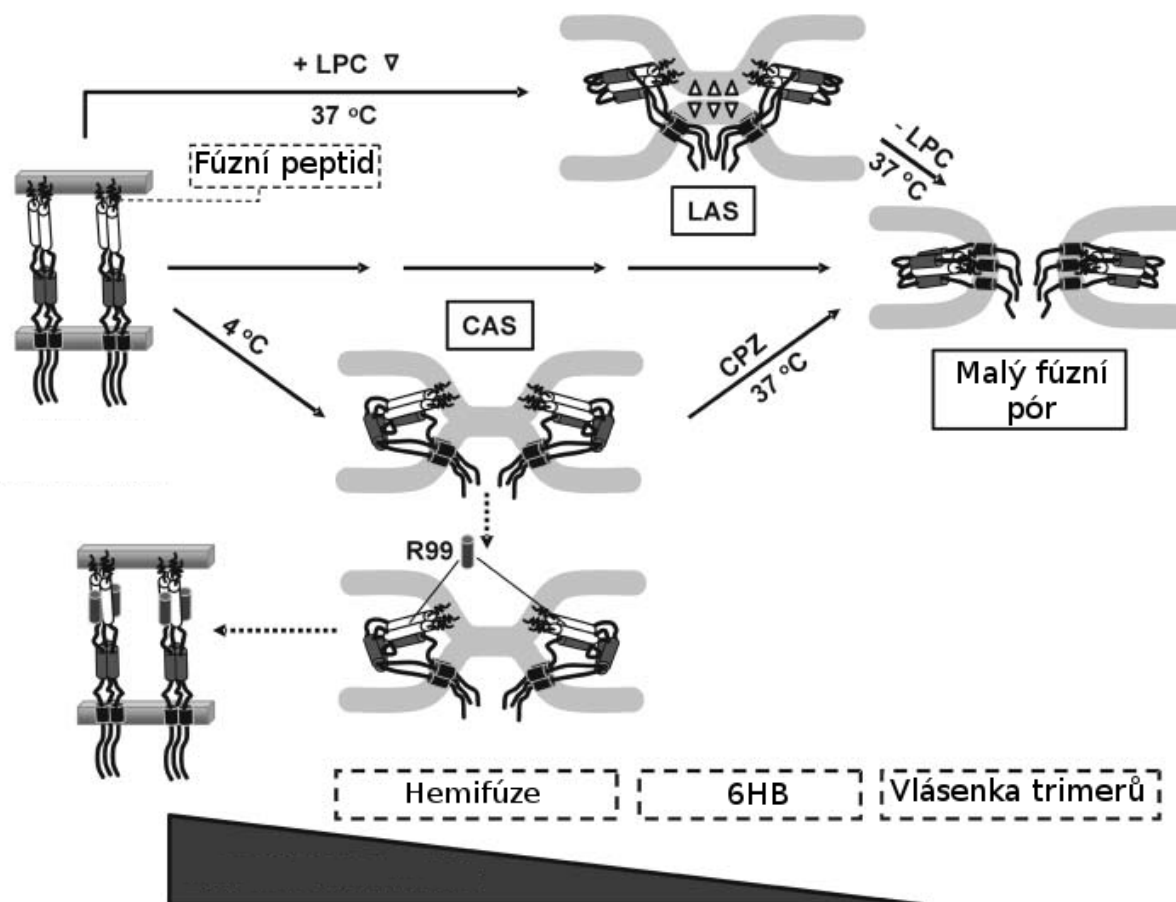
**Obrázek 4.1.4**

Strukturní znázornění postfúzního stavu trimerů TM podjednotek I. třídy rekombinantního bakteriálně exprimovaného hemaglutininu (a), rubulaviru (b), pneumoviru (c) a HIV (d). Modré kuličky znázorňují fúzní peptidy, červené kuličky transmembránové domény, modré helixy HR1 (HR-A, N-HR) a žluté helixy HR2 (HR-B, C-HR). Převzalo z Colman and Lawrence, 2003, review.

## 4.2 Dvoukroková aktivace

Jak již bylo zmíněno výše, zvláštní postavení má mechanismus fúze ASLV. Tato skupina retrovirů byla na přelomu tisíciletí intenzivně studována a dlouho odolávala vysvětlení zvláštních vlastností fúzního proteinu.

Jedny z prvních výsledků prezentovaly ASLV jako pH nezávislý retrovirus (Gilbert et al., 1990). Byl totiž porovnáván s typicky pH závislým virem, influenzavirem, a to pomocí experimentů s opůsobením virionů nízkým pH před inokulací nebo působením činidel neutralizující pH v endozomech. Další práce ale závislost na pH prokázaly a mylné interpretace vysvětlily jako důsledek dvoukrokové aktivace ALSV (Mothes et al., 2000).



**Obrázek 4.2.1**

Jako výchozí stav tvorby vlášenky je „narovnané“ TM se zanořeným fúzním peptidem do cílové membrány. Přimícháním LPC a inokulací v 37 °C nedochází k výměně lipidů mezi oběma membránami, což je označováno jako stádium zadržené lipidy (lipid-arrested stage, LAS). Při vystavení 4 °C bez LPS naopak k hemifúzi dochází, ne však k tvorbě fúzního póru, což je nazýváno jako stádium zadržené chladem (cold-arrested stage, CAS). K tomu dojde až po navýšení teploty na 37 °C a přidání CPZ. Je-li však před zvýšením teploty přidán R99, dojde k reverzi stavu až do napřímení celé TM podjednotky. Tmavý trojúhelník udává úroveň pH, zleva doprava klesá. Převzato z Markosyan et al., 2004.

První krok aktivace je závislý na interakci s receptorem. SU podjednotka envu po rozeznání odpovídajícího receptoru změní konformaci a navodí aktivaci TM podjednotky, která se sbalí do prefúzní formy. Fúzní peptid je vystrčen volně do prostoru a může asociovat s membránami (Melikyan et al., 2004). Tato změna může vést až k hemifúzi (vysvětleno níže), která podle některých prací může nastat už při neutrálním pH (Earp et al., 2003; Melikyan et al., 2004), podle jiných až v druhém kroku při okyselení (Matsuyama et al., 2004).

Druhý krok aktivace je analogický k influenzaviru; také struktura TM podjednotky je analogická k HA2. Postupné snižování pH vede k asociaci HR1 a HR2, sestavení 6HB a hemifúzi.

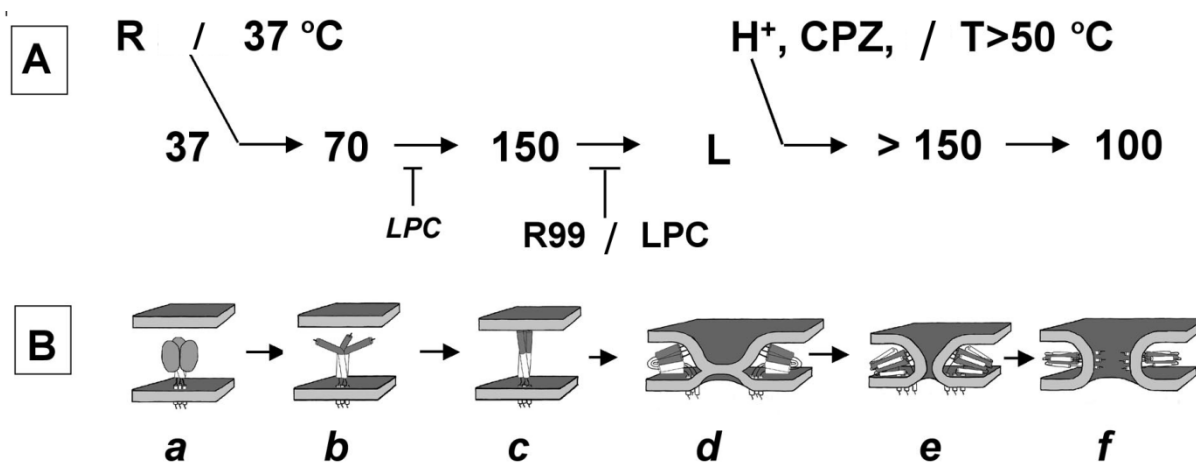
Prvním stupněm fúze je hemifúze. Jde o jev, kdy se vnější fosfolipidové vrstvy cílové a virové membrány spojí a promíchají, zatímco vnitřní vrstvy zůstávají nedotčeny. Stále se vedou spory o to, zda je tento děj závislý na snížení pH nebo probíhá i v pH neutrálním.

Druhým stupněm je tvorba fúzního póru, k čemuž dochází v okamžiku propojení vnitřní vrstvy membrán, které pak splynou v jednu. Fúzní pór nevzniká najednou, ale postupně roste až do velikosti, kdy může nukleokapsida opustit původní virovou membránu (Melikyan et al., 2005). Růst póru není ovlivněn pH, je však závislý na teplotě (Melikyan et al., 2004).

Existují dva způsoby jak experimentálně zablokovat virus ve stadiu hemifúze. Jedním z nich je snížení teploty pod 20 °C. Dalším je použití peptidů založených na HR1 a HR2 oblastech povrchového glykoproteinu. Zatímco peptidy odpovídající HR1 odvozené od jiných skupin virů dokáží jejich fúzi zabránit, ale efektivita inhibice je velice nízká, peptidy odpovídající HR2 ASLV jsou schopné fúzi těchto virů zcela zablokovat (Netter et al., 2004). Peptidy odvozené od HR2 se zřejmě vážou na HR1 oblast, kompetitivně inhibují asociaci obou oblastí TM, tvorbu 6HB a hemifúzi. Tento předpoklad je doložen zjištěním, že peptidy blokují fúzi jen za jejich přítomnosti v době mezi aktivací receptorem a následným snížením pH (Markosyan et al., 2004; Matsuyama et al., 2004). In vitro lze koinkubací ASLV-A a inhibujících peptidů vyselektovat celou řadu mutantů rezistentních k těmto peptidům. Některé mutace mapují do místa interakce s peptidem (tj. HR1 oblasti), jiné (překvapivě) mimo HR1. Tento druhý typ mutací se vyznačuje sníženým prahem pro aktivaci a schopností infikovat savčí buňky, zjevně využitím alternativních receptorů (Amberg et al., 2006). Dalším inhibitorem hodně využívaným při studiu fúze je lysofosfatidylcholin (LPC), který po inkorporaci do membrány zabraňuje jejímu ohybu ve směru potřebném k hemifúzi.

Jak již bylo řečeno, nízké pH je kritické pro tvorbu 6HB. To lze ale obejít několika způsoby. Jedním z nich je zvýšení teploty média na 50 °C (Markosyan et al., 2004), kdy zřejmě dochází v glykoproteinu k obdobným změnám jako při nízkém pH. Naopak, zvýšení závislosti fúze ASLV na nízkém pH lze dosáhnout pomocí 13-ti bodové delece SU EnvB v oblasti hr1 mezi zbytky 152 a 164 a/nebo pomocí mutace A32V v TM (Babel et al., 2007). Obě tyto mutace společně nebo každá zvlášť změní hodnotu potřebného pH k fúzi směrem k vyšší kyselosti.

Celkový děj, od receptorové aktivace až po plnou fúzi, trvá méně než 45 minut (Netter et al., 2004). Samotné obnažení HR1 a HR2 úseků před jejich složením do 6HB se pak odhaduje na 5 minut.



**Obrázek 4.2.2**

Linie A uvádí molekulární hmotnosti EnvA v kilodaltonech na SDS PAGE a podmínky, ve kterých probíhala inkubace.

V linii B jsou znázorněny různé konformační změny TM podjednotky EnvA. SU je znázorněna jen na obrázku a, protože není důležitá při samotné fúzi. Převzato z Matsuyama et al., 2004.

## 5 Závěr

V současné době stále pokračuje optimalizace retrovirových vektorů pro genovou respektive protinádorovou terapii. S tím je spojena potřeba řešit řadu problémů a hlouběji prozkoumat některé podrobnosti životního cyklu retrovirů. Předkládaná práce se zaměřila na shrnutí poznatků o některých z těchto úseků: nespecifické adsorpci virové částice na buněčný povrch, specifické interakci obalových glykoproteinů s receptory a řízené fúzi membrán virionu a buňky, zvláště pak těch, které se týkají ptačích sarkoma leukocytárních virů.

Nespecifická absorpce je nezávislá na obalových glykoproteinech virů, protože je zřejmě zprostředkována interakcí buněčných glukosaminů s virionem. Nespecifická adsorpce může dokonce viru citelně ublížit, neboť částice nasedají i na buňky necitlivé k infekci. Pokud se ovšem virion zachytí na buňky k infekci citlivé, může být prvotní kontakt následován „surfingem“, který zajistí dopravu virové částice až do míst vhodných k dalším krokům.

Oním dalším krokem je bezesporu specifická interakce envu ASLV a receptoru jako v každém slušném ligand-receptorovém systému. Po rozeznání receptoru unikátními variabilními úseky SU podjednotek dochází ke koordinovaným konformačním změnám TM podjednotek vedoucím postupně k vystřelení fúzních peptidů a jejich zasunutí do buněčné membrány. Envu fungují typicky ve formě trimerů, které v závěrečné fázi vytvoří tzv. šestihelikální svazek a vynutí si vytvoření fúzního póru. U některých retrovirů poslední fáze vyžaduje internalizaci komplexu a přesun do endosomů s nízkým pH. Tyto procesy mohou být narušeny našimi zásahy do struktury envu při snaze přesměrovat viriony do konkrétních buněčných typů; proto je velmi důležitá znalost jejich detailních molekulárních mechanismů. Výsledky však také ukazují na zajímavý jev, kdy mutací envu pravděpodobně paradoxně dochází k pravému opaku, totiž k destabilizaci SU do té míry, že je schopna se předčasně aktivovat, stát se nezávislá na receptoru a tím rozšířit hostitelský okruh viru. Důkladné přezkoumání tohoto jevu se jeví jako slibná cesta k dalšímu pochopení mechanismů env/receptor interakcí.

Po endocytóze dochází ve vakuole ke snižování pH. To je důležitý krok v postulovaném dvoukrokovém mechanismu, kdy po receptorové aktivaci dochází k přestavení celé podjednotky TM, nejprve do téměř lineární formy a následně do šesti helikálního svazku, v závislosti právě na pH. I přes tento unikátní dvoukrokový mechanismus se ASLV po boku HIV a chřipky řadí mezi viry s I. třídou fúzních proteinů.

## Literatura

- Adkins, H.B., Brojatsch, J., Naughton, J., Rolls, M.M., Pesola, J.M., and Young, J.A.T. (1997). Identification of a cellular receptor for subgroup E avian leukosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11617–11622.
- Adkins, H.B., Brojatsch, J., and Young, J.A.T. (2000). Identification and Characterization of a Shared TNFR-Related Receptor for Subgroup B, D, and E Avian Leukosis Viruses Reveal Cysteine Residues Required Specifically for Subgroup E Viral Entry. *J Virol* 74, 3572–3578.
- Adkins, H.B., Blacklow, S.C., and Young, J.A.T. (2001). Two Functionally Distinct Forms of a Retroviral Receptor Explain the Nonreciprocal Receptor Interference among Subgroups B, D, and E Avian Leukosis Viruses. *J Virol* 75, 3520–3526.
- Amberg, S.M., Netter, R.C., Simmons, G., and Bates, P. (2006). Expanded Tropism and Altered Activation of a Retroviral Glycoprotein Resistant to an Entry Inhibitor Peptide. *J Virol* 80, 353–359.
- Anderson, M.M., Lanning, A.S., Burns, C.C., and Overbaugh, J. (2000). Identification of a Cellular Cofactor Required for Infection by Feline Leukemia Virus. *Science* 287, 1828–1830.
- Babel, A.R., Bruce, J., and Young, J.A.T. (2007). The hr1 and Fusion Peptide Regions of the Subgroup B Avian Sarcoma and Leukosis Virus Envelope Glycoprotein Influence Low pH-Dependent Membrane Fusion. *PLoS ONE* 2, e171.
- Backovic, M., Jardetzky, T.S., and Longnecker, R. (2007). Hydrophobic Residues That Form Putative Fusion Loops of Epstein-Barr Virus Glycoprotein B Are Critical for Fusion Activity. *J Virol* 81, 9596–9600.
- Bahrami, S., Pagh, K., Ejegod, D., Duch, M., Tolstrup, M., and Pedersen, F.S. (2012). Construction of a Gammaretrovirus with a Novel Tropism and Wild-Type Replication Kinetics Capable of Using Human APJ as Entry Receptor. *J. Virol.* 86, 10621–10627.
- Barsov, E.V., Payne, W.S., and Hughes, S.H. (2001). Adaptation of Chimeric Retroviruses In Vitro and In Vivo: Isolation of Avian Retroviral Vectors with Extended Host Range. *J Virol* 75, 4973–4983.

- Bates, P., Young, J.A.T., and Varmus, H.E. (1993). A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor. *Cell* 74, 1043–1059.
- Batra, S.K., Castelino-Prabhu, S., Wikstrand, C.J., Zhu, X., Humphrey, P.A., Friedmann, H.S., and Bigner, D.D. (1995). Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 6, 1251–1259.
- Boerger, A.L., Snitkovsky, S., and Young, J.A.T. (1999). Retroviral vectors preloaded with a viral receptor-ligand bridge protein are targeted to specific cell types. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9867–9872.
- Bova, C.A., Manfredi, J.P., and Swanstrom, R. (1986). env genes of avian retroviruses: nucleotide sequence and molecular recombinants define host range determinants. *Virology* 152, 343–354.
- Bova, C.A., Olsen, J.C., and Swanstrom, R. (1988). The avian retrovirus env gene family: molecular analysis of host range and antigenic variants. *J Virol* 62, 75–83.
- Bova-Hill, C., Olsen, J.C., and Swanstrom, R. (1991). Genetic analysis of the Rous sarcoma virus subgroup D env gene: mammal tropism correlates with temperature sensitivity of gp85. *J Virol* 65, 2073–2080.
- Brojatsch, J., Naughton, J., Rolls, M.M., Zingler, K., and Young, J.A.T. (1996). CAR1, a TNFR-Related Protein, Is a Cellular Receptor for Cytopathic Avian Leukosis-Sarcoma Viruses and Mediates Apoptosis. *Cell* 87, 845–855.
- Buchhagen, D.L., and Hanafusa, H. (1978). Intracellular precursors to the major glycoprotein of avian oncoviruses in chicken embryo fibroblasts. *J Virol* 25, 845–851.
- Caporale, M., Cousens, C., Centorame, P., Pinoni, C., Heras, M.D. las, and Palmarini, M. (2006). Expression of the Jaagsiekte Sheep Retrovirus Envelope Glycoprotein Is Sufficient To Induce Lung Tumors in Sheep. *J Virol* 80, 8030–8037.
- Colman, P.M., and Lawrence, M.C. (2003). The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 309–319.



- Cosset, F.-L., and Lavillette, D. (2011). Cell Entry of Enveloped Viruses. *Adv Genet* 73, 121–183.
- Cosset, F.L., Morling, F.J., Takeuchi, Y., Weiss, R.A., Collins, M.K., and Russell, S.J. (1995). Retroviral retargeting by envelopes expressing an N-terminal binding domain. *J Virol* 69, 6314–6322.
- Damico, R., and Bates, P. (2000). Soluble Receptor-Induced Retroviral Infection of Receptor-Deficient Cells. *J Virol* 74, 6469–6475.
- Damico, R., Rong, L., and Bates, P. (1999). Substitutions in the Receptor-Binding Domain of the Avian Sarcoma and Leukosis Virus Envelope Uncouple Receptor-Triggered Structural Rearrangements in the Surface and Transmembrane Subunits. *J Virol* 73, 3087–3094.
- Damico, R.L., Crane, J., and Bates, P. (1998). Receptor-triggered membrane association of a model retroviral glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2580–2585.
- Davis, H.E., Morgan, J.R., and Yarmush, M.L. (2002). Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem* 97, 159–172.
- Dewannieux, M., and Collins, M.K. (2008). Spontaneous Heteromerization of Gammaretrovirus Envelope Proteins: a Possible Novel Mechanism of Retrovirus Restriction. *J Virol* 82, 9789–9794.
- Diaz-Griffero, F., Hoschander, S.A., and Brojatsch, J. (2003). Bystander Killing during Avian Leukosis Virus Subgroup B Infection Requires TVBS3 Signaling. *J Virol* 77, 12552–12561.
- Diaz-Griffero, F., Jackson, A.P., and Brojatsch, J. (2005). Cellular uptake of avian leukosis virus subgroup B is mediated by clathrin. *Virology* 337, 45–54.
- Dorner, A.J., Stoye, J.P., and Coffin, J.M. (1985). Molecular basis of host range variation in avian retroviruses. *J Virol* 53, 32–39.
- Earp, L.J., Delos, S.E., Netter, R.C., Bates, P., and White, J.M. (2003). The Avian Retrovirus Avian Sarcoma/Leukosis Virus Subtype A Reaches the Lipid Mixing Stage of Fusion at Neutral pH. *J Virol* 77, 3058–3066.

Einfeld, D., and Hunter, E. (1988). Oligomeric structure of a prototype retrovirus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8688–8692.

Elleder, D., Melder, D.C., Trejbalova, K., Svoboda, J., and Federspiel, M.J. (2004a). Two Different Molecular Defects in the Tva Receptor Gene Explain the Resistance of Two *tvar* Lines of Chickens to Infection by Subgroup A Avian Sarcoma and Leukosis Viruses. *J Virol* 78, 13489–13500.

Elleder, D., Plachý, J., Hejnar, J., Geryk, J., and Svoboda, J. (2004b). Close linkage of genes encoding receptors for subgroups A and C of avian sarcoma/leucosis virus on chicken chromosome 28. *Anim Genet* 35, 176–181.

Elleder, D., Stepanets, V., Melder, D.C., Šenigl, F., Geryk, J., Pajer, P., Plachý, J., Hejnar, J., Svoboda, J., and Federspiel, M.J. (2005). The Receptor for the Subgroup C Avian Sarcoma and Leukosis Viruses, Tvc, Is Related to Mammalian Butyrophilins, Members of the Immunoglobulin Superfamily. *J Virol* 79, 10408–10419.

England, J.M., Bolognesi, D.P., Dietzschold, B., and Halpern, M.S. (1977). Evidence That a Precursor Glycoprotein Is Cleaved to Yield the Major Glycoprotein of Avian Tumor Virus. *J Virol* 21, 810–814.

Fisher, G.H., Orsulic, S., Holland, E., Hively, W.P., Li, Y., Lewis, B.C., Williams, B.O., and Varmus, H.E. (1999). Development of a flexible and specific gene delivery system for production of murine tumor models. *Oncogene* 18, 5253–5260.

Forestell, S.P., Dando, J.S., Böhnlein, E., and Rigg, R.J. (1996). Improved detection of replication-competent retrovirus. *J Virol Methods* 60, 171–178.

Gilbert, J.M., Mason, D., and White, J.M. (1990). Fusion of Rous sarcoma virus with host cells does not require exposure to low pH. *J Virol* 64, 5106–5113.

Gilbert, J.M., Hernandez, L.D., Balliet, J.W., Bates, P., and White, J.M. (1995). Receptor-induced conformational changes in the subgroup A avian leukosis and sarcoma virus envelope glycoprotein. *J Virol* 69, 7410–7415.

Gray, E.R., Illingworth, C.J., Coffin, J.M., and Stoye, J.P. (2011). Binding of more than one Tva800 molecule is required for ASLV-A entry. *Retrovirology* 8, 96–107.

- Guibinga, G.H., Miyanohara, A., Esko, J.D., and Friedmann, T. (2002). Cell Surface Heparan Sulfate Is a Receptor for Attachment of Envelope Protein-Free Retrovirus-like Particles and VSV-G Pseudotyped MLV-Derived Retrovirus Vectors to Target Cells. *Mol Ther* 5, 538–546.
- Guo, J., Wang, W., Yu, D., and Wu, Y. (2011). Spinoculation Triggers Dynamic Actin and Cofilin Activity That Facilitates HIV-1 Infection of Transformed and Resting CD4 T Cells. *J Virol* 85, 9824–9833.
- Heldwein, E.E., Lou, H., Bender, F.C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., and Harrison, S.C. (2006). Crystal Structure of Glycoprotein B from Herpes Simplex Virus 1. *Science* 313, 217–220.
- Holmen, S.L., and Federspiel, M.J. (2000). Selection of a Subgroup A Avian Leukosis Virus [ALV(A)] Envelope Resistant to Soluble ALV(A) Surface Glycoprotein. *Virology* 273, 364–373.
- Hunter, E., Hill, E., Hardwick, M., Bhowan, A., Schwartz, D.E., and Tizard, R. (1983). Complete sequence of the Rous sarcoma virus env gene: identification of structural and functional regions of its product. *J Virol* 46, 920–936.
- Chai, N., and Bates, P. (2006). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 1 is a receptor for pathogenic subgroup J avian leukosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5531–5536.
- Chang, K.W., Barsov, E.V., Ferris, A.L., and Hughes, S.H. (2005). Mutations of a Residue within the Polyproline-Rich Region of Env Alter the Replication Rate and Level of Cytopathic Effects in Chimeric Avian Retroviral Vectors. *J Virol* 79, 10258–10267.
- Chesters, P.M., Howes, K., Petherbridge, L., Evans, S., Payne, L.N., and Venugopal, K. (2002). The viral envelope is a major determinant for the induction of lymphoid and myeloid tumours by avian leukosis virus subgroups A and J, respectively. *J Gen Virol* 83, 2553–2561.
- Chu, T.H., and Dornburg, R. (1995). Retroviral vector particles displaying the antigen-binding site of an antibody enable cell-type-specific gene transfer. *J Virol* 69, 2659–2663.
- Jang, J., Lee, J., Kim, S.-T., Lee, K.-Y., Cho, J.Y., Kweon, D.-H., Kwon, S.-T., Koh, Y.H., Kim, S., and Yoon, K. (2012). Polycation-mediated enhancement of retroviral transduction

efficiency depends on target cell types and pseudotyped Env proteins: Implication for gene transfer into neural stem cells. *Neurochem Int* 60, 846–851.

Joho, R.H., Billeter, M.A., and Weissmann, C. (1975). Mapping of biological functions on RNA of avian tumor viruses: location of regions required for transformation and determination of host range. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 4772–4776.

Katane, M., Takao, E., and Amanuma, H. (2002). Factors affecting the direct targeting of murine leukemia virus vectors containing peptide ligands in the envelope protein. *EMBO Rep* 3, 899–904.

Keshet, E., and Temin, H.M. (1979). Cell killing by spleen necrosis virus is correlated with a transient accumulation of spleen necrosis virus DNA. *J Virol* 31, 376–388.

Kielian, M. (2006). Class II virus membrane fusion proteins. *Virology* 344, 38–47.

Klucking, S., and Young, J.A.T. (2004). Amino acid residues Tyr-67, Asn-72, and Asp-73 of the TVB receptor are important for subgroup E avian sarcoma and leukosis virus interaction. *Virology* 318, 371–380.

Klucking, S., Collins, A.S., and Young, J.A.T. (2005). Avian Sarcoma and Leukosis Virus Cytopathic Effect in the Absence of TVB Death Domain Signaling. *J Virol* 79, 8243–8248.

Knauss, D.J., and Young, J.A.T. (2002). A Fifteen-Amino-Acid TVB Peptide Serves as a Minimal Soluble Receptor for Subgroup B Avian Leukosis and Sarcoma Viruses. *J Virol* 76, 5404–5410.

Lavillette, D., and Kabat, D. (2004). Porcine Endogenous Retroviruses Infect Cells Lacking Cognate Receptors by an Alternative Pathway: Implications for Retrovirus Evolution and Xenotransplantation. *J Virol* 78, 8868–8877.

Leamson, R.N., and Halpern, M.S. (1976). Subunit structure of the glycoprotein complex of avian tumor virus. *J Virol* 18, 956–968.

Lehmann, M.J., Sherer, N.M., Marks, C.B., Pypaert, M., and Mothes, W. (2005). Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol* 170, 317–325.

- Lin, P., Correa, D., Lin, Y., and Caplan, A.I. (2011). Polybrene Inhibits Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation during Lentiviral Transduction. *PLoS ONE* 6, e23891.
- Logg, C.R., Baranick, B.T., Lemp, N.A., and Kasahara, N. (2007). Adaptive Evolution of a Tagged Chimeric Gammaretrovirus: Identification of Novel cis-Acting Elements that Modulate Splicing. *J Mol Biol* 369, 1214–1229.
- Markosyan, R.M., Bates, P., Cohen, F.S., and Melikyan, G.B. (2004). A Study of Low pH-Induced Refolding of Env of Avian Sarcoma and Leukosis Virus into a Six-Helix Bundle. *Biophys J* 87, 3291–3298.
- Matsuyama, S., Delos, S.E., and White, J.M. (2004). Sequential Roles of Receptor Binding and Low pH in Forming Prehairpin and Hairpin Conformations of a Retroviral Envelope Glycoprotein. *J Virol* 78, 8201–8209.
- Melder, D.C., Pankratz, V.S., and Federspiel, M.J. (2003). Evolutionary Pressure of a Receptor Competitor Selects Different Subgroup A Avian Leukosis Virus Escape Variants with Altered Receptor Interactions. *J Virol* 77, 10504–10514.
- Melikyan, G.B., Barnard, R.J.O., Markosyan, R.M., Young, J. a. T., and Cohen, F.S. (2004). Low pH Is Required for Avian Sarcoma and Leukosis Virus Env-Induced Hemifusion and Fusion Pore Formation but Not for Pore Growth. *J Virol* 78, 3753–3762.
- Melikyan, G.B., Barnard, R.J.O., Abrahamyan, L.G., Mothes, W., and Young, J.A.T. (2005). Imaging individual retroviral fusion events: From hemifusion to pore formation and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8728–8733.
- Miller, A.D., and Chen, F. (1996). Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J Virol* 70, 5564–5571.
- Miller, D.G., and Miller, A.D. (1992). Tunicamycin treatment of CHO cells abrogates multiple blocks to retrovirus infection, one of which is due to a secreted inhibitor. *J Virol* 66, 78–84.

- Miyakawa, K., Fujita, R., Katane, M., Kubo, Y., and Amanuma, H. (2008). Effects of the ligand sequence modifications on the retargeted transduction by the retroviral vector having a ligand-chimeric Env protein. *J Gen Virol* 89, 3137–3143.
- Moelling, K., and Hayami, M. (1977). Analysis of precursors to the envelope glycoproteins of avian RNA tumor viruses in chicken and quail cells. *J Virol* 22, 598–607.
- Moore, J.P., McKeating, J.A., Weiss, R.A., and Sattentau, Q.J. (1990). Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* 250, 1139–1142.
- Moscatello, D.K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A.K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P.W., Biegel, J.A., Hayes, R.L., and Wong, A.J. (1995). Frequent Expression of a Mutant Epidermal Growth Factor Receptor in Multiple Human Tumors. *Cancer Res* 55, 5536–5539.
- Mothes, W., Boerger, A.L., Narayan, S., Cunningham, J.M., and Young, J.A.T. (2000). Retroviral Entry Mediated by Receptor Priming and Low pH Triggering of an Envelope Glycoprotein. *Cell* 103, 679–689.
- Narayan, S., Barnard, R.J.O., and Young, J.A.T. (2003). Two Retroviral Entry Pathways Distinguished by Lipid Raft Association of the Viral Receptor and Differences in Viral Infectivity. *J Virol* 77, 1977–1983.
- Nasir, A., Kim, K.M., and Caetano-Anolles, G. (2012). Giant viruses coexisted with the cellular ancestors and represent a distinct supergroup along with superkingdoms Archaea, Bacteria and Eukarya. *BMC Evol Biol* 12, 156.
- Netter, R.C., Amberg, S.M., Balliet, J.W., Biscone, M.J., Vermeulen, A., Earp, L.J., White, J.M., and Bates, P. (2004). Heptad Repeat 2-Based Peptides Inhibit Avian Sarcoma and Leukosis Virus Subgroup A Infection and Identify a Fusion Intermediate. *J Virol* 78, 13430–13439.
- O’Doherty, U., Swiggard, W.J., and Malim, M.H. (2000). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Spinoculation Enhances Infection through Virus Binding. *J Virol* 74, 10074–10080.
- Padilla-Parra, S., Matos, P.M., Kondo, N., Marin, M., Santos, N.C., and Melikyan, G.B. (2012). Quantitative imaging of endosome acidification and single retrovirus fusion with distinct pools of early endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 17627–17632.

- Pizzato, M., Marlow, S.A., Blair, E.D., and Takeuchi, Y. (1999). Initial Binding of Murine Leukemia Virus Particles to Cells Does Not Require Specific Env-Receptor Interaction. *J Virol* 73, 8599–8611.
- Pizzato, M., Blair, E.D., Fling, M.E., Kopf, J., Tomassetti, A., Weiss, R.A., and Takeuchi, Y. (2001). Evidence for nonspecific adsorption of targeted retrovirus vector particles to cells. *Gene Ther* 8, 1088–1096.
- Quadros, E.V., Nakayama, Y., and Sequeira, J.M. (2009). The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Blood* 113, 186–192.
- Rainey, G.J.A., and Coffin, J.M. (2005). Evolution of Broad Host Range in Retroviruses Leads to Cell Death Mediated by Highly Cytopathic Variants. *J Virol* 80, 562–570.
- Rainey, G.J.A., Natanson, A., Maxfield, L.F., and Coffin, J.M. (2003). Mechanisms of Avian Retroviral Host Range Extension. *J Virol* 77, 6709–6719.
- Reinišová, M., Šenigl, F., Yin, X., Plachý, J., Geryk, J., Elleder, D., Svoboda, J., Federspiel, M.J., and Hejnar, J. (2008). A Single-Amino-Acid Substitution in the Tvbs1 Receptor Results in Decreased Susceptibility to Infection by Avian Sarcoma and Leukosis Virus Subgroups B and D and Resistance to Infection by Subgroup E In Vitro and In Vivo. *J Virol* 82, 2097–2105.
- Roan, N.R., Müller, J.A., Liu, H., Chu, S., Arnold, F., Stürzel, C.M., Walther, P., Dong, M., Witkowska, H.E., Kirchhoff, F., et al. (2011). Peptides Released by Physiological Cleavage of Semen Coagulum Proteins Form Amyloids that Enhance HIV Infection. *Cell Host Microbe* 10, 541–550.
- Robinson, H.L., Astrin, S.M., Senior, A.M., and Salazar, F.H. (1981). Host Susceptibility to endogenous viruses: defective, glycoprotein-expressing proviruses interfere with infections. *J Virol* 40, 745–751.
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F.A., and Gaudin, Y. (2006). Crystal Structure of the Low-pH Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science* 313, 187–191.

- Rong, L., Edinger, A., and Bates, P. (1997). Role of basic residues in the subgroup-determining region of the subgroup A avian sarcoma and leukosis virus envelope in receptor binding and infection. *J Virol* 71, 3458–3465.
- Rong, L., Gendron, K., Strohl, B., Shenoy, R., Wool-Lewis, R.J., and Bates, P. (1998). Characterization of Determinants for Envelope Binding and Infection in Tva, the Subgroup A Avian Sarcoma and Leukosis Virus Receptor. *J Virol* 72, 4552–4559.
- Rous, P. (1910). A Transmissible Avian Neoplasm. (sarcoma of the Common Fowl.). *J Exp Med* 12, 696–705.
- Rous, P. (1911). A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* 13, 397–411.
- Ryu, B.Y., Zavorotinskaya, T., Trentin, B., and Albritton, L.M. (2008). The block to membrane fusion differs with the site of ligand insertion in modified retroviral envelope proteins. *J Gen Virol* 89, 1049–1058.
- Sarangi, A., Bupp, K., and Roth, M.J. (2007). Identification of a retroviral receptor used by an Envelope protein derived by peptide library screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11032–11037.
- Sattentau, Q.J., and Moore, J.P. (1991). Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J Exp Med* 174, 407–415.
- Sherer, N.M., Jin, J., and Mothes, W. (2010). Directional Spread of Surface-Associated Retroviruses Regulated by Differential Virus-Cell Interactions. *J Virol* 84, 3248–3258.
- Smith, E.J., Brojatsch, J., Naughton, J., and Young, J.A.T. (1998). The CAR1 Gene Encoding a Cellular Receptor Specific for Subgroup B and D Avian Leukosis Viruses Maps to the Chickentvb Locus. *J Virol* 72, 3501–3503.
- Snitkovsky, S., and Young, J.A.T. (1998). Cell-specific viral targeting mediated by a soluble retroviral receptor-ligand fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7063–7068.



Snitkovsky, S., and Young, J.A.T. (2002). Targeting Retroviral Vector Infection to Cells That Express Heregulin Receptors Using a TVA–Heregulin Bridge Protein. *Virology* 292, 150–155.

Snitkovsky, S., Niederman, T.M.J., Carter, B.S., Mulligan, R.C., and Young, J.A.T. (2000). A TVA–Single-Chain Antibody Fusion Protein Mediates Specific Targeting of a Subgroup A Avian Leukosis Virus Vector to Cells Expressing a Tumor-Specific Form of Epidermal Growth Factor Receptor. *J Virol* 74, 9540–9545.

Snitkovsky, S., Niederman, T.M.J., Mulligan, R.C., and Young, J.A.T. (2001). Targeting Avian Leukosis Virus Subgroup A Vectors by Using a TVA-VEGF Bridge Protein. *J Virol* 75, 1571–1575.

Somia, N.V., Zoppé, M., and Verma, I.M. (1995). Generation of targeted retroviral vectors by using single-chain variable fragment: an approach to in vivo gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7570–7574.

Taplitz, R.A., and Coffin, J.M. (1997). Selection of an avian retrovirus mutant with extended receptor usage. *J Virol* 71, 7814–7819.

Toyoshima, K., and Vogt, P.K. (1969). Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology* 38, 414–426.

Tsichlis, P.N., Conklin, K.F., and Coffin, J.M. (1980). Mutant and recombinant avian retroviruses with extended host range. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 536–540.

Valsesia-Wittmann, S., Drynda, A., Deléage, G., Aumailley, M., Heard, J.M., Danos, O., Verdier, G., and Cosset, F.L. (1994). Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. *J Virol* 68, 4609–4619.

Vogt, P.K., and Ishizaki, R. (1966). Patterns of viral interference in the avian leukemia and sarcoma complex. *Virology* 30, 368–374.

Weiss, R.A. (1993). Cellular Receptors and Viral Glycoproteins Involved in Retrovirus Entry. In *The Retroviridae*, (New York, USA: Plenum Press), pp. 1–108.

White, J.M., Delos, S.E., Brecher, M., and Schornberg, K. (2008). Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins: Multiple Variations on a Common Theme. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43, 189–219.

Wong, A.J., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Grzeschik, C.H., Humphrey, P.A., Bigner, D.S., and Vogelstein, B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2965–2969.

Young, J.A., Bates, P., and Varmus, H.E. (1993). Isolation of a chicken gene that confers susceptibility to infection by subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses. *J Virol* 67, 1811–1816.